

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E.A.P de Ciencias Biológicas**

**Detección del efecto antimutagénico del extracto  
acuoso del fruto de Myrciaria dubia H. B. K. Mc  
Vaugh “camu camu”, utilizando la prueba in vivo de  
micronúcleos**

**TESIS**

**Para optar al Título Profesional de Biólogo con mención en Biología  
Celular y Genética**

**AUTOR**

**Rafael Alvis Davila**

**Lima – Perú**

**2010**

## **AGRADECIMIENTOS**

La elaboración de una Tesis es un proceso muy arduo y complejo, que requiere mucho tiempo, dedicación y esfuerzo (sobre todo esfuerzo), no sólo de quien la realiza sino de toda la gente que le rodea. Es por esto que quiero hacer un especial agradecimiento a todas aquellas personas que me han apoyado durante estos años y gracias a ellos este trabajo ha sido posible.

En primer lugar mi agradecimiento a los Biólogos José Luis Pino Gavino y Betty Shiga Oshige, por darme la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación en el Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo de la UNMSM, gracias por su dedicación y su apoyo. Agradezco también, la colaboración de los profesores Jaime Descailleaux y Margarita Velásquez miembros del Departamento de Genética Humana en la elaboración de la Tesis.

Mil gracias a mis compañeros de laboratorio: Víctor Benavides Soto, José Gonzales, Luis Guzmán, Juan Carlos Francia y a Danae Liviac que han colaborado en la elaboración, presentación de los muchos artículos científicos, parte básica de esta Tesis. A todos ellos gracias por su amistad, por su apoyo incondicional.

Y mi familia, que puedo decir de ella, después de todo es gracias a ellos que estoy aquí...Gracias a mis padres y a mis hermanos por soportar mi mal humor después de un mal día de trabajo en el laboratorio, por apoyarme todos estos años, sobre todo estos muchos años que demoro en salir a la luz esta Tesis y por darme todo su apoyo a cambio de nada.

Gracias a todos.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ASA	Ácido ascórbico
- EROs	Especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species (ROS).
- INIA	Instituto Nacional de Innovación Agraria.
- Bcl-2	Linfoma de células B 2 - (B-cell lymphoma 2)
- p53	Proteína supresora de tumores - (53Tumor protein p53)
- MN	Micronúcleos
- EPC	Eritrocitos policromáticos
- ENC	Eritrocitos normocromáticos.
- EPCMN	Eritrocitos policromáticos micronucleados.
- ENCMN	Eritrocitos normocromáticos micronucleados.
- CN	Control Negativo.
- TI, TII, TIII, TIV	Tratamiento I, II, III y IV.
- CP	Control positivo.
- pc	Peso corporal.
- ip	Intraperitonealmente
- ppm	partes por millón.

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	i
ÍNDICE	ii
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1.- INTRODUCCIÓN	
1.1.- <i>Myrciaria dubia</i> H. B. K. Mc Vaugh "camu camu"	5
1.1.1.- Descripción botánica	6
1.1.2.- Composición química	7
1.1.3.- Propiedades terapéuticas	8
1.1.4.- Importancia	9
1.2.- Fluoruro de sodio	10
1.2.1.- Metabolismo y absorción de los fluoruros en el organismo humano	12
1.2.2.- Fluoruros en sangre	12
1.2.3.- Distribución en tejidos blandos	13
1.2.4.- Fluoruros en huesos y dientes	13
1.2.5.- Excreción de fluoruros por el riñón	16
1.2.6.- Efecto mutagénico de los fluoruros	16
2.- MARCO TEÓRICO	
2.1.- Mutagénesis	18
2.2.- Mutaciones en el ADN	19
2.2.1.- Mutación somática	19
2.2.2.- Mutación germinal	20
2.3.- Mutaciones inducidas por agentes mutagénicos	20
2.3.1.- Mutágenos físicos	20
2.3.2.- Mutágenos químicos	22
2.4.- Mutaciones y cáncer	23
2.5.- Antimutágenos	25
2.6.- Mecanismos de antimutagénesis	26
2.7.- Los ensayos de genotoxicidad	28
2.7.1.- Normativa Internacional de evaluación genotóxica	29
2.7.2.- Pruebas estándar de evaluación genotóxica	31
2.7.3.- Ensayos para la detección de genotoxicidad <i>in vivo</i>	32
2.7.4.- El ensayo <i>in vivo</i> de micronúcleos en ratones	33
2.7.5.- El ensayo citotoxicidad medular en ratones	36
3.- HIPÓTESIS	37

4.-	OBJETIVOS	37
4.1.-	Objetivo general	37
4.1.2.-	Objetivos específicos	38
5.-	MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1.	Material Biológico	39
5.1.1.-	Animales de experimentación	39
5.1.2.-	Planta a evaluar	39
5.2.	Material de laboratorio	39
5.2.1.-	Equipos	39
5.2.2.-	Reactivos	40
5.2.3.-	Insumos	40
5.3.	Métodos	40
5.3.1.-	Preparación del extracto acuoso del fruto de <i>Myrciaria dubia</i> H. B. K. Mc Vaugh "camu camu"	40
5.3.2.-	Tratamiento	40
5.3.3.-	Determinación de micronúcleos	41
5.3.3.1.-	Sacrificar a los ratones	41
5.3.3.2.-	Obtención de las células	41
5.3.3.3.-	Preparación del frotis	41
5.3.3.4.-	Fijación, coloración y sellado permanente	41
5.3.3.5.-	Análisis de Micronúcleos	42
5.3.3.6.-	Análisis de Citotoxicidad Medular	42
5.3.3.7.-	Análisis Estadístico	42
6.-	RESULTADOS	
6.1.	Frecuencia de micronúcleos en ratones machos	42
6.2.	Frecuencia de micronúcleos en ratones hembras	45
6.3.	Índice de Citotoxicidad	47
6.3.1.	Índice de Citotoxicidad en ratones machos	47
6.3.2.	Índice de Citotoxicidad en ratones hembras	48
7.-	DISCUSIÓN	50
8.-	CONCLUSIONES	56
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
10.-	ANEXO	88
10.1.-	Anexo I: Cuadros	75
10.2.-	Anexo II: Figuras	78
10.3.-	Anexo III: Fotografías	80

## RESUMEN

A fin de estudiar el efecto antimutagénico y citoprotector del extracto acuoso del fruto de *Myrciaria dubia* H. B. K. Mc Vaugh "camu camu", frente al daño producido por el Fluoruro de sodio, se evaluó su capacidad protectora en eritrocitos policromáticos de médula ósea de ratón. Se trabajó con individuos de la cepa albina Swiss Rockefeller divididos en dos grupos de 60 individuos de cada sexo. Se les dió de beber *ad libitum* el extracto acuoso del fruto de "camu camu", en concentraciones de 50, 25 y 5 mg/kg de peso corporal, respectivamente durante 10 días consecutivos, a un cuarto grupo se le suministro 25 mg/kg peso corporal de ácido ascórbico químicamente puro. Al control negativo se le inyectó agua *ad libitum* y al control positivo 125 mg/kg de ciclofosfamida vía intraperitoneal. Al décimo día de tratamiento se les inyectó una dosis única de 20mg/kg de fluoruro de sodio. Al décimo primer día los ratones fueron sacrificados para determinar la frecuencia de MN y el índice de citotoxicidad medular, en células sanguíneas de médula ósea siguiendo las pautas de Schmid, (1975).

Se obtuvo las frecuencias de eritrocitos micronucleados en los diferentes tratamientos  $3,1 \pm 1,79^*$  "TI",  $9,2 \pm 1,93^*$  "TII",  $26,8 \pm 6,10^{**}$  "TIII",  $12,3 \pm 3,62^*$  "TIV" para los ratones hembras y  $3,9 \pm 1,79^*$  "TI",  $11 \pm 2,58^*$  "TII",  $32 \pm 9,20^{**}$  "TIII",  $10,3 \pm 3,91^{**}$  "TIV" para machos. Siendo el valor promedio del Índice de citotoxicidad para los ratones machos de:  $1,59 \pm 0,42^{**}$  "TI",  $0,91 \pm 0,23^*$  "TII",  $0,81 \pm 0,21^*$  "TIII" y  $1,37 \pm 0,15^{**}$  "TIV", y para las hembras:  $1,59 \pm 0,42^*$  "TI",  $0,91 \pm 0,23^{**}$  "TII",  $0,81 \pm 0,21^{**}$  "TIII",  $1,37 \pm 0,15^{**}$  "TIV". Los resultados fueron analizados utilizando la prueba Paramétrica de Tukey con un nivel de significancia del 95% ( $p < 0.05$ ). Se observó diferencias significativas en la frecuencia de micronúcleos en los diversos tratamientos. Se determinó que a mayor concentración del extracto acuoso del fruto de "camu camu", hubo un mayor efecto antimutagénico y citoprotector sobre los eritrocitos de la médula ósea de ratón.

Se concluye que el extracto acuoso del fruto de *Myrciaria dubia* H. B. K. Mc Vaugh "camu camu", contrarrestó los efectos deletéreos del fluoruro de sodio, en eritrocitos de médula ósea de ratón.

**Palabras Claves:** "camu camu", fluoruro de sodio, micronúcleos, antimutagénico, ácido ascórbico.

## ABSTRACT

It was evaluated the protective ability of aqueous extract of the fruit of *Myrciaria dubia* H. B. K. Mc Vaugh "camu camu," in mouse bone marrow polychromatic erythrocytes to evaluated the antimutagenic effect against the mutagenic damage produced by sodium fluoride,. In this work, we used animals houses of the Rockefeller Swiss albino strain divided into two groups, 60 individuals from each sex. Those who drank ad libitum the aqueous extract of M dubia; TI = 50, TII = 25 and TIII = 5 mg / kg body weight respectively for 10 consecutive days; TIV drank 25 mg / kg body weight of ascorbic acid, the fifth group drank water ad libitum, the sixth group was intraperitoneally injected by 125 mg/kg of cyclophosphamide. The day tenth the mice were injected with a single dose of 20mg/kg of sodium fluoride. At day 11 mice were sacrificed to determine the frequency of MN and the rate of bone marrow cytotoxicity in bone marrow blood cells following the guidelines of Schmid (1975). The frequency of micronucleated erythrocytes was: TI =  $3.1 \pm 1.79^*$  TII =  $9.2 \pm 1.93^*$ , TIII =  $26.8 \pm 6.10^*$  TIV =  $12.3 \pm 3.62^*$ ; for females and TI =  $3.9 \pm 1.79^*$  TII =  $11 \pm 2.58^*$  and TIII =  $32 \pm 9.20^*$  TIV =  $10.3 \pm 3.91^*$  for males. The average values of the cytotoxicity index for male were: TI =  $1.59 \pm 0.42^*$ ; TII =  $0.91 \pm 0.23^*$ ; TIII =  $0.81 \pm 0.21^*$  and the TIV =  $1.37 \pm 0.15^*$ , for females the following values were obtained, TI =  $1.59 \pm 0.42^*$ ; TII =  $0.91 \pm 0.23^*$ ; TIII =  $0.81 \pm 0.21^*$  and TIV =  $1.37 \pm 0.15^*$ . These results were analyzed using parametric Tukey test with  $p < 0.05$  showing significant differences between them for the different treatments. It was determined that a higher concentration of the aqueous extract of the fruit of *Myrciaria dubia* produce the highest antimutagenic and cytoprotective effect on the erythrocytes of mice bone marrow. This did not happen with the group that was treated with cyclophosphamide, where polychromatic erythrocytes showed DNA damage as evidenced by the presence of MN.



In conclusion, the aqueous extract of the fruit of *Myrciaria dubia* H. B. K. Mc Vaugh "camu camu" counteracts the deleterious effects of sodium fluoride in erythrocytes of mouse bone marrow.

**Keywords:** "Camu camu", sodium fluoride, micronuclei, antimutagenic, ascorbic acid.

## 1.- INTRODUCCIÓN

### 1.1.- *Myrciaria dubia* H. B. K. Mc Vaugh "camu camu"

Es una planta oriunda de nuestra amazonia cuyo fruto posee el más alto contenido de ácido ascórbico (ASA) o vitamina C (alrededor de 2,780 mg/100 g de pulpa), casi 1000 veces más que la pulpa de naranja (Ascuña y Mourao 1997; Justi *et al.*, 2000). Debido a la elevada concentración de ASA, el "camu camu" es considerado como un frutal nativo de primer orden para la agroindustria (Chavez y Wanders, 1993). Es utilizado como suplemento alimenticio e inmunoestimulante, por que aumenta las defensas del organismo ejerciendo una acción preventiva y terapéutica contra la agresión celular causada por la oxidación de especies reactivas del oxígeno (EROs) (Meydani, 2000; Lee *et al.*, 2004).

El "camu camu" es un frutal arbustivo que crece en las orillas anegables de ríos amazónicos de agua negra y presenta una mayor población en los departamentos de Loreto y Pucallpa (Pinedo, 2004). Su distribución natural indica que la mayor concentración se encuentra en la amazonía peruana, a lo largo de los ríos Ucayali, Amazonas y sus afluentes, en el sector ubicado entre las localidades de Pucallpa (sobre el río Ucayali) y Pebas (sobre el río Amazonas). La prospección de germoplasma efectuada por el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Perú (Mendoza *et al.*, 1989) concluye que las zonas donde se observa la mayor cantidad de plantas es en la quebrada del Supay, tributario del Bajo Ucayali, y el río Nanay, tributario del Alto Amazonas. Chávez y Wanders (1993) indican que el "camu camu" se encuentra a lo largo del río Amazonas hasta el estado de Amazonas en Brasil, así como en la cuenca superior del río Orinoco y en el estado de Rondonia, Brasil. Sin

embargo, la presencia de la especie en estas zonas no es tan frecuente y abundante como la observada a lo largo de los ríos y lagos en la Amazonía peruana (Peters y Vásquez, 1986; Chávez y Wanders 1993; Ascuña y Mourao 1997).

#### 1.1.1.- Descripción botánica

Reino: Vegetal

División: Fanerógamas

Subdivisión: Angiospermas

Clase: Dicotiledóneas

Orden: Myrtales

Familia: Myrtaceae

Género: *Myrciaria*

Especie: *Myrciaria dubia* H. B. K.

Nombre Científico: *Myrciaria dubia* H. B. K Mc Vaugh

Nombre Común: “camu camu”/ Vitamina C Natural

Parte de la Planta empleada: Fruto

Se ha clasificado como *Myrciaria dubia* H. B. K Mc Vaugh y como *Myrciaria paraensis* Berg (Mc Vaugh, 1958, 1963), pero los taxónomos han optado por *M. dubia* debido a que ésta fue la primera denominación válida utilizada. Las principales diferencias entre éstas dos variedades de “camu camu” son; en que una es arbustiva (*Myrciaria dubia*) y la otra arbórea (*Myrciaria spp*). La variedad arbustiva cuya fruta tiene el más alto contenido de ASA, crece de manera silvestre en las orillas de los ríos, cochas y cursos menores de agua en la amazonía (Villachica, 1996). El “camu camu” es un arbusto que puede llegar a medir hasta 4 m de altura; se ramifica desde su base formando varios tallos secundarios. El tallo y las ramas son glabros, cilíndricos, lisos, de color

marrón claro o rojizo y con corteza que se desprende de forma natural. Sus raíces son profundas y con muchos pelos absorbentes. Las hojas pueden variar entre 4,5 y 12 cm de longitud y el ancho entre 1,5 y 4,5 cm; presentan el ápice muy puntiagudo y la base redondeada. La inflorescencia es axilar con varias de ellas emergiendo del mismo punto, pétalos en número de cuatro, color blanco, de 3 a 4 mm de largo, aovados, cóncavos, glandulosos, ciliados. Estambres con 7 a 10 mm de largo; anteras con 0,5 a 0,7 mm de largo. Cáliz con los sépalos diferenciados; el ovario de posición ínfero (Ferreyra, 1959).

El fruto del “camu camu” es globoso de superficie lisa y brillante, puede presentar color rojo oscuro y variar hasta negro púrpura al madurar; de diámetro entre 2 a 4 cm; con una a cuatro semillas por fruto, encontrándose más frecuentemente de dos a tres semillas y de un peso promedio alrededor de 8.4 g por fruto. Las semillas son reniformes, aplanadas con tamaño entre 8 a 11 mm de longitud y 5.5 a 11 mm de ancho, cubiertas por una vellosidad blanca rala de menos de un mm de longitud. El peso de 1,000 semillas secas pesan entre 650 a 760 g mientras que cuando solamente han sido escurridas y oreadas a la sombra pesan entre 1,000 y 1,250 g (Burckhardt y Couturier, 1988).

#### **1.1.2.- Composición química**

Si bien el fruto del “camu camu” es pequeño, este posee el más alto contenido de ASA o vitamina C al compararlo con otras fuentes naturales, como es el caso del limón (*Citrus aurantifolia*) y la acerola (*Malpighia emarginata*) (Chavez y Wanders, 1993). Los primeros análisis químicos revelan un contenido de 2.780 mg por cada 100 g de pulpa de “camu camu”, la superioridad de esta fruta en comparación con otras especies consideradas fuentes importantes de vitamina C es evidente, ya que el nivel de concentración de este nutriente en materia de análisis llega a ser 60 veces más (Chavez y Wanders, 1993; Villachica *et al.*, 1998). Así mismo el contenido proteínas en

el fruto del “camu camu” es similar al que se encuentran en la piña, maracuyá, fresa, limón, guayaba y la acerola. En cambio, la presencia de carbohidratos es parecido o menor al que se encuentra en otras frutas tropicales conocidas (Villachica 1996). Chávez y Wanders (1993) manifiestan que en la cáscara del fruto de “camu camu” se puede encontrar hasta 5 g de ASA por cada 100 g de cáscara seca y también es apreciada por el alto contenido de flavonoides y pectinas (Cuadro N° 1 y 2).

### **1.1.3.- Propiedades terapéuticas**

El uso de las plantas amazónicas está ampliamente difundido en la medicina natural alternativa del Perú, el conocimiento ancestral del uso de estas plantas medicinales en las comunidades de la amazonía peruana permite en la actualidad el acceso a curación alternativa para el mundo moderno. Sin embargo, estas aplicaciones validadas en su mayoría por el conocimiento popular como consecuencia de métodos ensayo resultado y no cuentan con un respaldo científico. Los pobladores amazónicos tienen diversas modalidades para el uso del “camu camu”; las propiedades terapéuticas de este fruto son las de favorecer la formación del colágeno, proteína que sostiene muchas estructuras corporales que promueve la formación de los huesos, dientes, encías, vasos sanguíneos y piel (Balz, 1994). La corteza del tallo se utiliza para el tratamiento del reumatismo y es aplicada localmente para aliviar dolores musculares, en cambio la raíz es comúnmente utilizada para aliviar los cólicos estomacales (Hininger *et al.*, 2005).

Asimismo, la fiebre y el dolor de cabeza son tratados con emplastos de las hojas trituradas, igualmente previene las infecciones y evita el escorbuto, del mismo modo se tiene información de que su corteza y tallo consumidos en infusión son excelentes remedios para la diabetes (Collazos, 1993). Adicionalmente es considerado astringente, antioxidante, anti-inflamatorio, anti-viral, anti-migrañas y anti-depresivo. Se utiliza como suplemento alimenticio debido a su propiedad de estimular las defensas

naturales del organismo e interviniendo en la absorción del fierro procedente de los alimentos de origen vegetal (Hininger *et al.*, 2005).

#### **1.1.4.- Importancia**

Dentro de la diversidad de frutales nativos existentes en la amazonía peruana, el “camu camu” resalta por sus notables características, como elevada concentración de ASA, tolerancia a las inundaciones y adaptación a suelos ácidos (Pinedo, 2004). Durante mucho tiempo este frutal pasó desapercibido, hasta que en 1957 el Instituto de Nutrición del Ministerio de Salud del Perú, realizó el primer análisis bromatológico de la fruta, arrojando resultados sorprendentes por el gran contenido de ASA (2700 mg por 100 g de pulpa) es decir más cantidad de vitamina C que un limón (42 mg/ 100 g de jugo). Debido al creciente interés por el gran potencial que presenta el desarrollo de la actividad agroindustrial y farmacológica con fines de exportación a nivel mundial, el uso de sustancias naturales y orgánicas ubicadas en las plantas medicinales hacen que las investigaciones en el tema tengan un riguroso control de calidad y un respaldo científico a fin de que contribuyan a una mejor calidad de vida del ser humano. Además, al quedar demostradas las propiedades de nuestra flora medicinal, se puede aprovechar éstas para promover el desarrollo de cultivos de bancos de germoplasma y mantener la variabilidad genética que hay en nuestra amazonía. La investigación en productos naturales puede ser guiada por el conocimiento etnofarmacológico, y puede dar contribuciones sustanciales en la innovación de medicamentos, descubriendo principios activos y mecanismos de acción nuevos (Emerton, 2000).

Actualmente se ha introducido el “camu camu” en los mercados de los países desarrollados como EE. UU., Japón y Alemania, donde los productos alimenticios naturales y altamente nutritivos son preferidos por la población; el “camu camu” es muy apreciado para el consumidor humano en estos países por su alto potencial

antioxidante (Requena-Condori, 2008). Es así, que la demanda por este fruto se ha incrementado considerablemente, lo cual exige un mayor número de investigaciones sobre las propiedades atribuidas a esta planta, con la finalidad de elevar su valor en el mercado nacional e internacional (Cuadro N° 3).

## **1.2.- Fluoruro de sodio**

El fluoruro de sodio, es una de las sales con flúor más investigadas en lo referente a su metabolismo. Tiene un peso molecular de 42 g/mol (PM=42), el producto comercial suele contener entre 94 - 97% de fluoruro de sodio y 1.5 - 3% de fluoruro sódico de silicio. Tiene una densidad de 2.8 g/l y su punto de fusión es de 993°C, es soluble en 25 partes de agua, insoluble en etanol. La solución tiene la propiedad de corroer el vidrio. Si se acidifica libera ácido fluorhídrico. En los preparados de 1000 ppm de flúor, el fluoruro de sodio constituye el 0.22% del dentífrico. En estas formulaciones el fluoruro es altamente ionizable por lo que se vuelve activo tan pronto se introduce en la boca (Herazo, 1994).

Es el compuesto que más se ha utilizado para los programas de prevención de caries dental, ya sea individuales, grupales o masivamente en grandes poblaciones (Ghosh *et al.*, 2002). La pasta dental fluorada con NaF fue introducida al mercado de los países industrializados a finales de los años 60, y desde entonces su uso se ha extendido en el mundo (Twetman *et al.*, 2003). El efecto preventivo de este producto ha sido demostrado en la literatura científica (WHO, 1994; Marinho *et al.*, 2003; Twetman *et al.*, 2003), por lo que su utilización es ampliamente recomendada para la prevención de la caries dental (Craig, 2000; MINSA, 2001).

Es conocido el hecho de que la boca es una de las principales vías de entrada, de muchos compuestos tóxicos que tienen su primer contacto con el organismo por medio de la mucosa bucal. Dicha mucosa es constantemente agredida por sustancias tales como el NaF que se encuentra en concentraciones variables en los productos dentales, como son pastas y geles, los cuales son usados diariamente por la población en general (Mascarenhas, 2000). El NaF ha sido reconocido que puede ser una sustancia tóxica para el organismo cuando es ingerido en la dieta en animales de experimentación ocasionando daño al hígado e induciendo la expresión de las caspasas y de la proteína bcl-2 (proteína antiapoptosis) activada durante la apoptosis (Morales-González *et al.*, 2004; Zhan *et al.*, 2005).

El mecanismo de acción es a través del bloqueo del metabolismo celular; inhibe la glucólisis, interfiere en el metabolismo del calcio y altera la conducción de los impulsos nerviosos (Chaleil *et al.*, 1986). En el lumen gástrico, el flúor está presente como ácido fluorhídrico, esta molécula no ionizada atraviesa fácilmente la membrana de las células epiteliales, penetrando al interior de las células donde se disocia en iones fluoruro e hidrogeniones, los cuales lesionan estructuras y alteran funciones celulares por ruptura de la barrera mucosa gástrica (Beinlich *et al.*, 2003).

A nivel celular, ha sido reconocido que la intoxicación con NaF puede generar radicales libres, peroxidación lipídica y la alteración de sistemas de defensa antioxidantes (Rzeuski *et al.*, 1998). Se ha estudiado el efecto crónico de toxicidad por NaF en las diversas alteraciones metabólicas tales como inhibición de la glucólisis, alteración de receptores de membrana, alteraciones en el balance energético total, ruptura del ADN e inducción de apoptosis (Monsour y Kruger 1985; Shivarajashankara *et al.*, 2001). En este último caso, se ha postulado que la apoptosis inducida por un exceso en la ingesta de fluoruro es producida en parte por un fenómeno asociado a la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) las cuales, al ser moléculas altamente reactivas, pueden inducir alteraciones a las biomoléculas como son las



proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. (Gutiérrez-Salinas y Morales-González, 2004).

Ha sido descrito que la aplicación del NaF como principal fuente de fluoruro a células en cultivo puede inducir un exceso en la expresión de la proteína p53 que es una proteína que se expresa cuando existe daño al ADN (Wang *et al.*, 2005). Por otro lado, ha sido descrita la inducción de apoptosis en células epiteliales de pulmón humano cultivadas con cantidades crecientes de NaF, así como alteraciones generales en macrófagos alveolares en cultivo (Refsnes *et al.*, 1998; Hidaro y Ando, 1996).

#### **1.2.1.- Metabolismo y absorción de los fluoruros en el organismo humano**

El flúor contenido en el agua potable se absorbe casi totalmente (95-97%) y en menor proporción el unido a los alimentos razón por la cual la principal vía de incorporación del flúor en el organismo humano es la digestiva (Figura N° 1). Es absorbido rápidamente en la mucosa del estómago y del intestino delgado, por un simple fenómeno de difusión (Neuman *et al.*, 1950; Zipkin *et al.*, 1956). Una vez absorbido, el flúor pasa a la sangre y se difunde a los tejidos, fijándose específicamente en los tejidos calcificados por los que tiene gran afinidad, como son los huesos y los dientes. Se excreta fundamentalmente por la orina interviniendo en el pH urinario, de tal manera que una orina alcalina y un flujo urinario dan lugar a una eliminación más eficaz y rápida del fluoruro presente en el plasma sanguíneo (Largent, 1952; Burt, 1999; Waterhouse *et al.*, 1980).

#### **1.2.2.- Fluoruros en sangre**

En la sangre una vez que ingresa el flúor, éste puede estar en forma orgánica e inorgánica. Por lo general el flúor esta en forma de iones y su vida media plasmática es de 4 a 10 horas (Cortés, 2000), tras la ingestión el valor máximo se alcanza en unos 30 a 60 minutos más tarde y regresa a su valores habituales a las 3 ó 6 horas después. Su equilibrio en plasma se encuentra relacionado con la dosis y la frecuencia de la ingestión de tal manera que a mayor dosis y frecuencia hay mayor concentración plasmática (Fluoride recommendations work group, 2001).

### **1.2.3.- Distribución en tejidos blandos**

La cantidad de flúor en el organismo es variable y depende de la ingestión, inhalación, absorción y eliminación, así como de las características de los compuestos. Generalmente se concentra en huesos, cartílagos, dientes (Largent, 1952; Whitford, 1989), y placa bacteriana (Beltarn y Burt, 1988). Su concentración en la mayor parte de los tejidos blandos es inferior a su nivel plasmático, salvo en el riñón sano, en el que se puede producir un acumulo ocasional de fluoruro a causa de la producción de orina (Mella *et al.*, 1994). En mujeres gestantes atraviesa la placenta y el nivel en sangre fetal es de un 75% con respecto al de la sangre materna (Rigalli *et al.*, 2001). No obstante, otros autores refieren que no alcanza concentraciones adecuadas en el feto debido a la rápida eliminación renal de la madre y a su rápido depósito en los huesos (Carlton, 2006).

### **1.2.4.- Fluoruros en huesos y dientes**

La asimilación del fluoruro en el esqueleto y en la dentadura depende de la cantidad ingerida y absorbida, de la duración de la exposición al fluoruro y de la clase, localización y actividad metabólica del tejido de que se trate así como de la edad del sujeto. La afinidad existente entre el fluoruro y el prototipo óseo (hidroxiapatita), así

como gran afinidad por el calcio ha sido ampliamente probada (Beinlich, 2003). En condiciones normales el fluoruro se acumula en el esqueleto a lo largo de la vida, de forma que su contenido en los huesos orienta de modo fiable sobre el grado de exposición de un individuo a los fluoruros a lo largo del tiempo. Al ingerirse durante largo tiempo una elevada cantidad de fluoruros, se observa una estrecha relación entre su concentración plasmática y nivel óseo (Carlton, 2006).

La fijación a los tejidos dentales también aumenta con la edad y con la mayor concentración de flúor ingerido, no obstante, en un mismo individuo hay menos flúor en dentina y esmalte respecto al hueso. Por su parte, la dentina tiene un contenido de fluoruros cuatro veces mayor que el esmalte (Beinlich, 2003). La mayor parte del flúor presente en la superficie del esmalte se adhiere en la fase de maduración pre-eruptiva (nacimiento hasta erupción del segundo molar), persistiendo concentraciones elevadas de fluoruro a lo largo de la vida del diente. Hasta algo después de la erupción (maduración post eruptiva hasta los 14 años), es muy probable que el esmalte siga siendo lo suficientemente poroso para absorber fluoruro con relativa facilidad ya sea por vía tópica o sistémica (Rigalli, 2001). Algunos autores consideran que inmediatamente después de que el diente rompa la encía y haga erupción en la cavidad bucal comienza una importante reacción química entre la superficie del esmalte y el medio químico de la boca que dura unos 2 a 3 años, siendo por tanto en este periodo cuando el efecto tópico del fluoruro ejerce su mayor beneficio (Carlton, 2006).

El flúor tópico se absorbe al parecer fácilmente a lo largo de la vida, en lugares donde el esmalte es poroso incluso cuando la caries comienza a dañarlo, se mantiene intacto, en cambio el esmalte maduro absorbe fluoruros con mucho mayor dificultad

(Fluoride recommendations work group, 2001). En las zonas del diente en el que el esmalte está recubierto de sarro, la concentración aumenta con la edad en el esmalte, pero disminuye en la capa externa de las zonas más incisivas no recubiertas por el sarro, pero expuestos al desgaste. Es en estos casos que se trata tópicamente el esmalte maduro con concentraciones altas de flúor (Riordan, 2002). Su importancia en la medicina se sustenta en que ha sido la piedra angular de las estrategias contra la caries dental a escala mundial, debido a su eficacia, seguridad y economía (Marinho *et al.*, 2002).

El principal riesgo asociado a la administración de fluoruros es la posibilidad de desarrollar fluorosis dental, que consiste en la hipomineralización caracterizada por una mayor porosidad del esmalte, y es el resultado de la ingesta excesiva de fluoruro durante el periodo de formación (Burt y Eklund, 1992). La severidad de la condición dependerá de la dosis, el momento y la duración de la ingesta de flúor (Burt y Eklund, 1992; Browne *et al.*, 2005). El riesgo de desarrollar fluorosis dental y esquelética ha sido asociado al consumo de productos fluorados, como pastas dentales, por niños menores de seis años (Pendrys, 2000), debido principalmente a la deglución de pasta dental con flúor (Skotowski, Hunt, Levy, 1995; O'Mullane, 2004), siendo la concentración de flúor ingerido dependiente de la cantidad de pasta dental que se coloca en el cepillo (O'Mullane, 2004; Browne *et al.*, 2005).

La legislación peruana establece que el contenido de flúor en forma de NaF en la pasta dental a ser comercializada en el país debe encontrarse en el rango de 1000 a 1500 ppm en el caso de los adultos y ser menor a 600 ppm en el caso de la indicada para niños. En el Perú se agrega flúor a la sal de consumo humano desde 1985, y se

promueve la utilización de pastas dentales para la higiene dental de la población (MINSA, 2001).

#### **1.2.5.- Excreción de fluoruros por el riñón**

El riñón es la principal vía de excreción de los fluoruros, se filtra por el glomérulo y se reabsorbe en los túbulos proximales por difusión pasiva (Figura N° 1). En su eliminación interviene el pH urinario, de tal manera que una orina alcalina y un flujo urinario rápido da lugar a una eliminación rápida del fluoruro del plasma (Burt, 1999). Habitualmente en la orina del adulto, se encuentra un 40 - 60% de la dosis ingerida. No obstante, este porcentaje puede variar, pues está influenciado por el grado de fijación en los huesos, que a su vez depende de la edad y de la ingestión anterior o actual de los fluoruros. Por consiguiente, el metabolismo a corto plazo del fluoruro está regulado por el riñón y a largo plazo por el hueso (American Dietetic Association, 2000).

#### **1.2.6.- Efectos mutagénicos de los fluoruros**

A nivel celular, el fluoruro puede presentarse como NaF, alterando diversas rutas metabólicas como la glucólisis, en el balance energético total (Monsour & Kruger 1985), favoreciendo la producción de las EROs. Así mismo induce alteraciones a nivel del citoplasma, así como en el material genético (Gutiérrez-Salinas y Morales-González, 2004). Otros autores reportan la inducción de apoptosis en células epiteliales de descamación bucal, y en tratamientos *in vitro* en células procedentes de pulmón humano (Hidaro y Ando, 1996; Refsnes *et al.*, 1998).

Dosis elevadas de NaF administradas a mamíferos pequeños de experimentación produjeron efectos adversos en el sistema reproductivo tales como la disminución de la fertilidad y el daño a los testículos, conllevando una disminución en la producción de espermatozoides (Ghosh *et al.*, 2002). Igualmente induce aberraciones cromosómicas y síntesis de ADN no programada al observarse una disminución de la capacidad de formación de colonias en cultivo de fibroblastos humanos (Tsutsui *et al.*, 1984).

De otro lado, en diversos estudios se demuestra las propiedades antimutagénicas, (Ghaskadbi y Vaidya 1989; Kojima H. *et al.*, 1992; Khan y Sinha 1993), antigenotóxicas (Hoda y Sinha, 1993); anticlastogénicas (Vijayalaxmi y Venu, 1999) del ASA, debido a su capacidad antioxidativa frente a la acción de los radicales libres (Chatterjee *et al.*, 1995). Así que considerando los antecedentes mencionados, en este estudio se evaluó el efecto antimutagénico y citoprotector del extracto acuoso del fruto de *Myrciaria dubia* H. B. K. Mc Vaugh “camu camu”, contra el daño causado por el NaF a nivel del material genético, en eritrocitos policromáticos presentes en medula ósea de ratón; a través de la prueba *in vivo* de micronúcleos (MN).

## **2.- MARCO TEORICO**

### **2.1. - Mutagénesis**

La mutagénesis es la parte de la Genética que estudia las mutaciones en relación con su génesis, transmisión y detección. Consecuentemente, los mutágenos son los agentes físicos o químicos capaces de inducir, directa o indirectamente, mutaciones (Miller y Miller, 1981). Considerando al gen como la información hereditaria contenida en un segmento determinado del ADN, con una estructura lineal definida por la secuencia de pares de bases que lo componen, una mutación puntual puede considerarse como un cambio en la secuencia de pares de bases que alterando la expresión del gen da lugar a un individuo mutante (Auerbach y Kilbey, 1971). Por lo general, las mutaciones son cambios que se producen de manera espontánea en la secuencia del ADN y que pueden dar origen a características beneficiosas o bien a enfermedades genéticas. Los cambios en la estructura molecular pueden consistir en la simple sustitución de una base, con lo cual varía el triplete y esto hace que exista un cambio en la síntesis del aminoácido de cualquier proteína o enzima, o bien existirá una pérdida o adición de una base, lo cual también cambia el codon y el marco de la lectura del código genético (Griffiths *et al.*, 2008).

Pueden producirse también, mutaciones más extensas como la pérdida de un segmento completo del ADN, pero que por ser del orden de las moléculas, no pueden ser detectadas por los métodos citológicos, como se hace con las deleciones cromosómicas. Estos cambios no siempre van a producir enfermedad ya que en ocasiones generan una característica que es favorable al individuo en uno u otro aspecto. En general, se acepta que las mutaciones son también beneficiosas para las

especies porque a través de ellas se logra la evolución de las mismas (Auerbach y Kilbey, 1971).

## **2.2.- Mutaciones en el ADN**

En un contexto general, se refiere a cualquier cambio del material genético de las células no debido a fenómenos de recombinación o segregación, que se transmite a las células hijas y las generaciones sucesivas, dando lugar a células o individuos mutantes (Kumar y Subramanian, 2002). Siendo la mutación en el ADN, la fuente primaria de la variabilidad genética y como tal es indispensable para que se produzcan los fenómenos evolutivos (Brusick, 1980).

Las mutaciones pueden clasificarse de diversas formas:

### **2.2.1.- Mutación somática**

Afecta a las células somáticas del individuo una vez que una célula sufre una mutación, todas las células que derivan de ella por divisiones mitóticas heredarán la mutación (herencia celular). El efecto será mayor si la mutación somática se ha producido en un estadio temprano del desarrollo, donde células indiferenciadas originan diversos tejidos y órganos diferenciados; sin embargo, el aumento en la incidencia de tumores que se viene observando en niños muy pequeños hacen pensar que la exposición paterna o materna a cancerígenos podría ser, en estos casos, el factor que desencadena el desarrollo de un tumor (Fabia y Thuy, 1974, Holly *et al.*, 1992, Winn *et al.*, 1992, Sharpe *et al.*, 1995).



### **2.2.2.- Mutación germinal**

En las especies con reproducción sexual, es afectada en las células de la línea germinal son afectadas y la mutación se transmite por los gametos detectándose la mutación sólo en la descendencia (Alberts *et. al.*, 2000). Una mutación a este nivel puede perpetuarse en la población y originar individuos que llevan la mutación, tanto en sus células somáticas como en la línea germinal (Croce 2008; Kumar, 2002).

### **2.3.- Mutaciones inducidas por agentes mutagénicos**

El material genético está expuesto a diferentes tipos de daños o agresiones que pueden tener un origen endógeno o exógeno (Hoffmann, 1996; Brusick, 1987). Los de tipo endógeno pueden derivarse del propio metabolismo celular o del ADN, mientras que los de tipo exógeno se deben a la exposición a agentes físicos o químicos medioambientales (Friedberg *et al.*, 1995). Todos estos agentes provocan diferentes grados de lesión en el ADN lo cual puede llegar a afectar el desarrollo normal del organismo. Algunos además son mutágenos cancerígenos como los plaguicidas, radiaciones ionizantes, tabaco, subproductos industriales, incineradores. Por ello los ataques al ADN son múltiples y se producen a diario (Natarajan, 1986).

Los mutágenos de acuerdo a su naturaleza se clasifican en agentes físicos como las temperaturas altas y las radiaciones (ionizantes y no ionizantes). En los agentes químicos tenemos a los que tienen capacidad alquilante e intercalante (Mahata, 2004).

#### **2.3.1.- Mutágenos físicos**

Los mutágenos físicos son las radiaciones, que pueden ser ionizantes y no ionizantes. Las ionizantes son radiaciones electromagnéticas con muy corta y alta

frecuencia, por lo que su energía es muy alta. Corresponden a los rayos  $\alpha$ , X,  $\beta$  y  $\gamma$  (Perdiz *et al.*, 2000; Afag, 2001; Clydesdale *et al.*, 2001; De Gruijl, 2002). Sin embargo, las radiaciones no ionizantes y en particular la radiación ultravioleta han sido motivo de estudios recientes, dado el deterioro creciente de la capa de ozono y el efecto perjudicial de esta radiación para la salud de los organismos y en especial para el hombre (Trautinger, 2001). Las radiaciones ionizantes tienen gran poder de penetración y pueden provocar la ionización de las sustancias que atraviesan e interaccionan directamente sobre el ADN o de manera indirecta al ionizarse antes a otras sustancias y éstas al actuar sobre el ADN denominándose procesos de foto carcinogénesis (Kozmin *et al.*, 2003). Además hay un efecto genético, ya que las partículas ionizadas son muy reactivas y reaccionan con estos componentes, provocando mutaciones. También pueden provocar cambios en la estructura de los cromosomas o en las enzimas provocando un efecto fisiológico (Trautinger, 2001; Verschooten, 2006a).

Las radiaciones no ionizantes tiene menor penetración en los tejidos y su efecto es algo más suave. Pueden originarse por absorción directa de la energía de los fotones (Rochette *et al.*, 2003) o mediante lesiones indirectas donde los cromóforos endógenos transfieren la carga a otras moléculas que son las que provocan las modificaciones en el ADN (Verschooten *et al.*, 2006a), destaca los rayos UV del cual nos llega dos tipos: los UVA y UVB entre 320-400 y 290-320 nm respectivamente (Kuluncsics *et al.*, 1999; Rochette *et al.*, 2003).

Ambos provocan cáncer de piel, los UVA provocan la formación de radicales libres, que son muy reactivos y reaccionan con el ADN. Los UVB son absorbidos por el ADN para formar los dímeros de timina y de citosina (Perdiz *et al.*, 2000; Clydesdale *et al.*, 2001; De Gruijl, 2002).

### 2.3.2.- Mutágenos químicos

Las investigaciones pioneras en el campo de la mutagénesis inducida por agentes químicos vieron sus primeros frutos cuando Auerbach y Robson demostraron en 1946 la capacidad mutagénica del gas mostaza (sulfuro de dicloroetilo,  $\text{ClCH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{Cl}$ ) y sus derivados. El desarrollo tecnológico lleva consigo un aumento de la polución y contaminación ambiental que puede dañar a la especie humana, animales y vegetales incidiendo directamente en el material genético (Albertini, 2000).

Algunos compuestos químicos son suficientemente parecidos a las bases nitrogenadas del ADN, ocasionalmente pueden incorporarse a éste en lugar de las bases normales, tales compuestos se llaman análogos de bases (Bartsch *et al.*, 1999). Una vez en su sitio tienen propiedades de emparejamiento distintas de aquellas a las que han sustituido, de este modo, causan mutaciones al provocar que, durante la replicación, se inserten frente a ellas nucleótidos incorrectos (Bartsch *et al.*, 1999; Albertini, 2000).

Los agentes químicos con propiedades alquilantes, funcionan por medio de tres mecanismos diferentes, los cuales alcanzan el mismo resultado la interrupción de la función del ADN y la muerte celular (Xue y Warshawsky, 2005). El primer mecanismo consiste en adherir grupos alquilo a las bases del ADN, esta alteración resulta en que el material genético sea fragmentado por las enzimas de reparación cuando éstas tratan de reemplazar las bases alquiladas (Zong *et al.*, 2004).

Un segundo mecanismo por el cual estos agentes químicos causan daño al ADN es en la formación de puentes cruzados, uniones entre átomos en el ADN. En este proceso, dos bases nitrogenadas son unidas por medio de un agente alquilante que tiene dos sitios de unión con el ADN. Estos puentes pueden ser formados dentro de una sola molécula de ADN o como puentes cruzados se conectan dos moléculas distintas de ADN (Zong *et al.*, 2004; Xue y Warshawsky 2005).

Un último mecanismo de acción es la inducción de nucleótidos dispares llevando a mutaciones. En una doble hélice normal de ADN, donde la adenina (A) siempre se empareja con la timina (T) y la guanina (G) siempre se empareja con citosina (C), las bases alquiladas G pueden ser emparejadas erróneamente con T. Si esta alteración sucede y no es corregida, esto puede resultar en una mutación permanente (Xue y Warshawsky, 2005; Cruz-Bustillo, 2004).

Los agentes químicos intercalantes, son moléculas planas que imitan pares de bases y son capaces de deslizarse entre las bases nitrogenadas apiladas en el núcleo de la doble hélice, mediante un proceso de intercalación. En esta posición el agente puede producir deleciones de un par de nucleótidos (Yu, 1999).

## **2.4.- Mutaciones y cáncer**

En el ciclo celular la división celular está muy controlada para evitar la proliferación desordenada de las células (Sanchez, 2006). Este control le dice a la célula cuando debe dividirse y cuando no debe hacerlo. Si los mecanismos que controlan la división fallan, las nuevas células se dividen descontroladamente formando una masa llamada tumor. Es benigno si proliferan con lentitud y se mantienen juntas. Si se dividen con rapidez y se separan para invadir otros órganos es denominado maligno, formando tumores secundarios o metástasis (Cruz-Bustillo, 2004).

La masa de células del tumor sustrae los nutrientes al tejido que lo alberga, estos van perdiendo actividad, y son deformados por el tumor que va creciendo. El organismo pierde reservas y los distintos sistemas sufren lesiones que lo colapsan hasta que al final muere (Rajagopalan, 2002). Hoy día está claro que existe una relación entre la aparición de cambios en el ADN como sustituciones, translocaciones, deleciones, roturas y el desarrollo de procesos de transformación células (Rapp, 2008).

Para que una célula normal se convierta en célula tumoral o cancerosa debe acumular mutaciones, en los genes que controlan la división celular (Weinstein y Joe, 2008). Fundamentalmente el cáncer aparece por acumulación de mutaciones que se heredan a las células que derivan de ella, que sufren más mutaciones. Los genes que controlan la división celular y, por tanto la aparición del tumor, son de tres tipos:

- Protooncogenes: Están en todas las células del individuo, cuando mutan se convierten en oncogenes, que estimulan la proliferación celular al producir en gran cantidad unas proteínas que estimulan la división (Leon y Pellicer, 1993). Normalmente están reprimidos y las mutaciones son dominantes, es decir, basta que un solo gen mute para se origine el cáncer. La conversión puede ser por una mutación puntual o cambios estructurales. Las deleciones y traslocaciones hacen cambiar genes de su posición original, y los pone en contacto con nuevas genes reguladores lo que los transforma en oncogenes (Weinstein y Joe, 2008).
- Supresores de tumores o antioncogenes: La célula cuenta con genes muy importantes cuyos productos proteicos vigilan la secuencia normal de la división celular, permitiendo la proliferación y diferenciación en el momento adecuado del ciclo celular. Para que una mutación inactive estos genes debe afectar al gen que codifica la proteína que inhibe la división celular, por lo tanto, no se frena la división. Si la mutacion se da en los genes supresores de tumores, los oncogenes actúan sin control. Un tipo especial de genes supresores son los genes que inducen la muerte celular programada de células que tienen el ADN dañado. Si estos genes mutan, la célula no muere.
- Genes de reparación del ADN: Normalmente están activos y reparan las lesiones que sufre el ADN evitando así la aparición de mutaciones (Harper y

Elledge, 1996). Sus proteínas reparan de manera espontánea las lesiones provocadas por muchos mutágenos ambientales. Sin embargo, dado el continuo ataque que sufre el ADN, estos genes también sufren cambios apareciendo daños, lesiones y mutaciones en el ADN (Weinstein y Joe, 2008).

## **2.5.- Antimutágenos.**

El término “antimutagénesis” fue usado inicialmente por Novik y Szilard en el año 1951, cuando notaron que la presencia de nucleótidos normales de purinas en un medio de crecimiento causaba una reducción significativa de la frecuencia de mutaciones de resistencia a los fagos en la población bacteriana. Kada en 1984, postuló que la antimutagénesis “es el proceso mediante el cual se reduce la frecuencia de mutaciones espontáneas o inducidas”. Tomando como referencia este concepto, la acción antimutagénica de un compuesto queda definida como “la característica o acción de esta sustancia para disminuir o evitar el daño mutacional en el ADN de la célula” (Kada, 1984).

Según Wattenberg 1981, los antimutágenos pueden ser agrupados en dos grandes categorías: los agentes bloqueadores, que impiden que los carcinógenos alcancen o reaccionen con los sitios diana, y los agentes supresores que previenen la evolución de los procesos neoplásicos (Wattenberg, 1980). En el año 1987, Kada y sus colaboradores clasifican a los antimutágenos en desmutágenos y bioantimutágenos, usada hasta la actualidad (Kada *et al.*, 1987). En general, el término desmutágeno se refiere a aquellos agentes que actúan en forma directa con el mutágeno, modificándolo ya sea en su estructura química o bioquímicamente, es decir trayendo consigo reacciones de metabolización dentro del organismo antes de que el mutageno alcance la molécula blanco. Por su parte, los bioantimutágenos, son agentes biológicamente activos que interfieren con las funciones celulares que determinan los procesos de mutagénesis o reparación del ADN dañado, conllevando a

una disminución de la frecuencia de las mutaciones tanto inducidas como espontáneas (Simic *et al.*, 1997).

## **2.6.- Mecanismos de antimutagénesis.**

Las células vivas están adaptadas a reaccionar cotidianamente contra potenciales efectos mutagénicos y carcinogénicos de componentes fisiológicos y no solamente cuando se encuentran en un ambiente ocasional desafiante. Además de los factores de protección presentes en la misma, crean una eficiente barrera que tiende a disminuir la dosis activa de los agentes deletéreos (De Flora *et al.*, 2001). Estos pasos tempranos son la expresión final de una serie de eventos complejos, involucrados por ejemplo, en la entrada de un compuesto, su distribución y transporte a órganos y tejidos, penetración dentro del metabolismo y/o células blanco, acceso al núcleo, cambios en la molécula blanco y finalmente, la fijación del daño genotóxico. Todos estos factores que preceden la iniciación y los pasos subsecuentes de la carcinogénesis, son afectados por factores del hospedero y gobernados por el balance entre dos fuerzas opuestas como la activación metabólica y la detoxificación, la formación de derivados electrofílicos y bloqueo por nucleófilos, generación de especies reactivas del oxígeno y eliminación por antioxidantes, cambios en el ADN y reparación, promoción y antipromoción (Ramel, 1986).

Para el uso racional de los agentes quimiopreventivos es esencial no sólo evaluar su utilidad y eficacia sino también indagar sobre los mecanismos involucrados (De Flora *et al.*, 2001). Por tanto, para caracterizar la actividad antimutagénica de un compuesto se necesita conocer los rasgos esenciales de su modo de acción: si es un desmutágeno o un bioantimutágeno, si actúa de forma directa o indirecta, si su acción es específica para determinados tipos de mutágenos y si sólo actúa con relación a procesos celulares específicos. A esto se une el hecho de que existen varios agentes

quimiopreventivos que operan mediante múltiples mecanismos, con una alta eficacia y un amplio espectro de acción. Se ha planteado que es conveniente combinar los agentes quimiopreventivos de manera que exista una complementación de los mecanismos de acción (De Flora *et al.*, 1998).

Para determinar si la potencialidad antimutagénica de un compuesto investigado es de carácter desmutagénico o bioantimutagénico, el procedimiento más generalizado consiste en evaluar, de forma comparativa, las respuestas mutacionales obtenidas al aplicar tres variantes fundamentales de tratamiento: cotratamiento (compuesto y mutágeno a la vez), pretratamiento (primero el compuesto y a continuación el mutágeno en ausencia del compuesto) y post-tratamiento (primero el mutágeno y a continuación el compuesto).

Según De Flora y colaboradores (1997), los inhibidores de la mutagénesis y la carcinogénesis actúan por impedimento o modulación de la cascada de eventos involucrados en los pasos consecutivos de mutaciones y cáncer. De manera general los mismos operan mediante los siguientes mecanismos:

- Mecanismos extracelulares.

Dentro de los mecanismos que tiene el organismo para protegerse de aquellos agentes que puedan ser mutagénicos o carcinogénicos se encuentra la inhibición de la entrada de estos agentes a la célula y su formación endógena, así como la desactivación de los mismos ya sea por medio de mecanismos físicos o químicos y su absorción por agentes protectores.

- Inhibición de la mutación e iniciación del cáncer por mecanismos celulares.

La célula puede impedir la aparición de mutaciones o de células malignas atrapando agentes foráneos y detoxificándolos, modificando el transporte de membrana,



modulando el metabolismo y la reparación del ADN e inhibiendo la replicación celular y el control de la expresión génica.

- Inhibición de la promoción del tumor.

En este caso, los mecanismos propuestos están encaminados a inhibir los efectos mutagénicos mediante la protección de los puntos de comunicación intercelulares, la modulación de las señales de transducción, estimulación de la actividad antioxidante y la eliminación de radicales libres así como la inhibición de la proliferación celular e inducción de la diferenciación y apoptosis celular.

## **2.7.- Los ensayos de genotoxicidad**

El concepto de genotoxicidad es un término amplio que hace referencia a cualquier tipo de daño causado sobre el material genético. La fijación y transmisión del cambio inducido en el ADN, bajo la forma de mutación génica, cambios cromosómicos estructurales o cambios cromosómicos numéricos, es considerado un suceso esencial en la inducción de defectos hereditarios (entre ellos las enfermedades genéticas humanas) y la aparición de procesos cancerígenos (ICH S2B, 1997). También se considera implicada en diversos procesos relacionados con la salud, como el envejecimiento, el fallo reproductivo, la toxicidad sobre el desarrollo y diversas enfermedades cutáneas, hematológicas u óseas originadas por mutaciones somáticas (Kramer, 1998; Erickson, 2003).

En este sentido, los ensayos de genotoxicidad se definen como ensayos *in vitro* e *in vivo* diseñados para detectar agentes que inducen daño genético de forma directa o indirecta, mediante diversos mecanismos. Si bien en su origen fueron desarrollados para la detección de agentes capaces de producir defectos hereditarios, mediante la

inducción de mutaciones en células germinales, en la actualidad los ensayos de genotoxicidad constituyen una herramienta esencial en la determinación de riesgo cancerígeno, evaluando sus efectos en células somáticas. Existen evidencias sustanciales de que las mutaciones que causan alteraciones en oncogenes y genes supresores de tumores en las células somáticas están implicadas en la inducción de cáncer en animales de experimentación y en humanos.

### **2.7.1.- Normativa Internacional de evaluación genotóxica**

En el caso particular de los efectos genotóxicos en la sociedad, las autoridades reguladoras internacionales asumen que para sustancias genotóxicas *in vivo* no existe, a priori, un umbral de efecto. Este principio se fundamenta sobre el “dogma” de que, en términos de probabilidad, existe el riesgo de que la interacción de una única molécula genotóxica con el ADN del organismo pueda dar lugar a la formación de una lesión precancerosa o premutágena, y que el efecto producido sobre el material genético es irreversible y acumulativo. En consecuencia, aunque la probabilidad pueda ser extremadamente baja, no se puede definir un nivel de exposición asociado a riesgo genotóxico. En base a este principio teórico, para las autoridades reguladoras las sustancias genotóxicas presentan un mecanismo de acción carente de umbral de efecto por lo que, a priori, no son aplicables los conceptos de nivel de exposición seguro y margen de seguridad. No obstante, este principio está ampliamente cuestionado, ya que no toma en consideración procesos biológicos de homeostasis y reparación, e ignora el concepto de homeostasis, una observación ampliamente reconocida en cancerogénesis química y radiológica (Calabrese y Baldwin, 2003; Humfrey, 2007).

En la actualidad, se es consciente de la naturaleza compleja de los mecanismos que conducen al desarrollo de los procesos cancerosos, más allá de la

simple asunción de que una molécula cancerígena causa una mutación que, mediante un proceso azaroso, conduce al desarrollo tumoral (Humfrey, 2007), así como de la existencia de procesos o mecanismos, que no siendo directamente genotóxicos, también parecen jugar un papel en la cancerogénesis (Kramer, 1998). En consecuencia la obtención de resultados positivos en los ensayos de genotoxicidad puede tener un fuerte impacto sobre la viabilidad del proceso de desarrollo de un fármaco. A pesar de ello, las autoridades reguladoras reconocen, sobre una base pragmática, la existencia de niveles de exposición a agentes genotóxicos que no están asociados a riesgo cancerígeno (o asociados a riesgo cancerígeno “aceptable”).

La valoración del potencial genotóxico de un agente xenobiótico es un campo de trabajo fuertemente regulado por directrices internacionales. Entre éstas destacan las directrices de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico que corresponden a protocolos experimentales específicos y detallados para ensayos individuales con sustancias químicas en general, y las directrices ICH, específicas para productos farmacéuticos, que hacen referencia a aspectos generales de diseño y estrategia. Los ensayos empleados habitualmente corresponden a ensayos bien establecidos y ampliamente aceptados por la comunidad científica internacional. Estos ensayos se realizan siguiendo protocolos rigurosos que optimizan la capacidad de detectar un posible potencial genotóxico, con el fin de asegurar que un resultado negativo puede ser aceptado con un grado suficiente de confianza, también existen directrices en elaboración como es por ejemplo el caso del ensayo de micronúcleos *in vitro* e *in vivo*, el ensayo de cometa que se dispone de recomendaciones elaboradas por grupos internacionales de expertos (ICH S2B, 1997; Kramer, 1998; Zeiger, 1998).

### 2.7.2.- Pruebas estándar de evaluación genotóxica

De acuerdo con las actuales recomendaciones científicas y los requerimientos de las autoridades reguladoras, el potencial genotóxico de una nueva entidad química ha de ser valorado mediante la realización de una batería de ensayos *in vitro* e *in vivo* de genotoxicidad (ICH S2B, 1997; Zeiger, 1998). Esto responde principalmente a dos objetivos. El primero es reducir el riesgo de obtener falsos negativos, en el sentido que sustancias con potencial genotóxico real no sean detectadas adecuadamente. El segundo objetivo es poder detectar posibles efectos genotóxicos en los diferentes niveles estructurales de organización del ADN.

Los ensayos que valoran la inducción de aberraciones cromosómicas estructurales también permiten valorar, en cierta forma, la inducción de aberraciones cromosómicas numéricas. Aunque en la actualidad existe una mayor evidencia en favor de la actuación como carcinógenos completos de sustancias que inducen aberraciones estructurales frente a aquellas que modulan exclusivamente el número cromosómico (como los inhibidores del huso mitótico o de la citocinesis), ambos tipos de aberraciones cromosómicas se consideran implicados en la inducción de defectos congénitos y abortos (Norppa y Falck, 2003).

En este sentido, las directrices ICH sobre genotoxicidad (ICH S2B, 1997), recomiendan la realización, como mínimo, de los siguientes ensayos que integran la denominada batería estándar (Cuadro N° 4):

- Ensayo *in vitro* de mutación génica en bacterias o Test de Ames
- Ensayo *in vitro* mutación génica y/o aberraciones cromosómicas en células de mamífero
- Ensayo del linfoma de ratón o de aberraciones cromosómicas
- Ensayo *in vivo* aberraciones cromosómicas en células hematopoyéticas de roedor.

- Ensayo de micronúcleos en roedor o test de micronúcleos.

Los ensayos que integran esta batería son considerados eficaces y reproducibles, y de amplia aceptación por la comunidad científica internacional como predictivos de potencial genotóxico y cancerígeno. Estos ensayos se consideran complementarios entre ellos, y su realización debe permitir evaluar la capacidad de la sustancia en estudio de inducir mutación génica y aberraciones cromosómicas estructurales (clastogenicidad) y/o numéricas (aneugenicidad).

Existe cierta variabilidad de opinión respecto al número, tipo y extensión de los ensayos que deberían integrar una batería mínima de ensayos de genotoxicidad. Para algunos investigadores la inclusión de un mayor número de ensayos conllevaría el incremento en el número de resultados positivos irrelevantes obtenidos, reduciendo la credibilidad de los ensayos de genotoxicidad. Para otros, la inclusión de un mayor número de ensayos reduciría la incidencia de falsos negativos, reforzando la credibilidad de los ensayos de genotoxicidad (Müller *et al.*, 1999). Si bien se han sugerido diferentes estrategias alternativas a la de la batería estándar, en todas ellas se propone una aproximación secuencial en la que los resultados obtenidos en unos primeros ensayos, que valoran efectos sobre los diferentes niveles estructurales del DNA, supeditan la realización de estudios adicionales (Pfuhler *et al.*, 2007).

### **2.7.3.- Ensayos para la detección de Genotoxicidad *in vivo***

Los ensayos de genotoxicidad *in vivo* realizados en mamíferos pequeños son considerados un componente fundamental en el diagnóstico del riesgo genotóxico (Müller *et al.*, 1999). Además es el paso inicial en los trabajos que tienen una mayor similitud entre el sistema experimental y la especie final de estudio que viene a ser el hombre, siendo mayor el valor predictivo y la relevancia que se le atribuye al resultado

obtenido. Es en este contexto que los ensayos *in vivo* reproducen la complejidad de un organismo completo y como tal, toman en consideración los procesos biológicos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (Norppa y Falck, 2003; Bonassi *et al.*, 2007). Estos procesos determinan la exposición real del ADN y el efecto tóxico de la sustancia en estudio o a cualquiera de sus posibles efectos, que no pueden ser reproducidos en los modelos *in vitro*. Asimismo, a los modelos *in vivo* se les atribuye un mayor nivel y grado de eficiencia en los mecanismos de reparación del ADN (Müller *et al.*, 1999).

En consecuencia, la obtención de un resultado positivo en un ensayo *in vivo* se toma como fuerte evidencia de potencial genotóxico (Müller *et al.*, 1999). Los ensayos *in vivo* de genotoxicidad implican, como norma general, la utilización de roedores de laboratorio (rata o ratón). Si bien son varios los modelos experimentales disponibles, el ensayo de MN en eritrocitos de roedor es, en cualquiera de sus variantes, el ensayo *in vivo* más empleado en la valoración del potencial genotóxico de sustancias químicas. Como tal, es el ensayo *in vivo* recomendado por las autoridades reguladoras internacionales como parte de la batería estándar de ensayos de genotoxicidad (Norppa y Falck, 2003; Bonassi *et al.*, 2007).

#### **2.7.4.- El ensayo *in vivo* de micronúcleos en ratones**

La presencia de micronúcleos (MN) en eritrocitos, es conocido en el campo de la hematología bajo el nombre de “cuerpos de Howell-Jolley”, estos se pueden definir como estructuras cromatínicas presentes en el citoplasma, sin ninguna conexión aparente con el núcleo de la célula. Los MN se originan a partir de fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros que durante el proceso de división celular quedan retrasados en la fase de segregación cromosómica (anafase), no siendo por este motivo incorporado en el núcleo de la célula hija. Estos cromosomas o

fragmentos cromosómicos permanecen visibles en el citoplasma de la célula interfásica bajo la apariencia de un pequeño núcleo de ahí su denominación de “micronúcleo” (Matter y Schmid, 1971; Heddle, 1973).

La utilización del ensayo de MN como una prueba realizada *in vivo* para la detección del potencial genotóxico de un agente xenobiótico, fue propuesta por primera vez a principios de la década de 1970, de forma independiente, por Schmid (Matter y Schmid, 1971; Schmid, 1975) y por Heddle (1973). La prueba *in vivo* de MN se caracteriza en la capacidad de las sustancias en estudio al inducir la formación de MN en los eritroblastos (células precursoras de los eritrocitos) de la médula ósea, linaje celular el cual está en constante proliferación y por lo tanto es ideal para evaluar la inducción de daño genotóxico por agentes clastógenicos, que producen roturas cromosómicas y/o aneunógenicos, provocando pérdida de cromosomas por interacción con el huso mitótico (Norppa y Falck, 2003; Bonassi *et al.*, 2007). Un MN es fácilmente reconocible y observable en los eritrocitos anucleados. La presencia del ácido ribonucleico (ARN) en el interior del citoplasma de los eritrocitos recién formados adoptan una coloración azul al ser teñidos con el colorante Giemsa, siendo denominados eritrocitos policromáticos (EPC). La desaparición gradual del ARN provoca que los eritrocitos más maduros adopten una coloración rosa-anaranjada, siendo denominados eritrocitos normocromáticos (ENC) (Norppa y Falck, 2003).

Se estima que se necesita un tiempo de 10 a 12 h para la primera aparición de MN en un EPC tras la exposición a un agente genotóxico. Es este el tiempo necesario para que tenga lugar, la progresión del eritroblasto hacia la mitosis, el posible retraso mitótico inducido por el tratamiento, la propia formación de los MN a partir de fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros no incluidos en el núcleo de la célula hija y la extrusión del núcleo principal tras la última mitosis para convertirse en EPC. Los EPC recién formados permanecen en la médula ósea de ratón aproximadamente unas 20 h. Durante este tiempo se producirá la acumulación de

EPC micronucleados (EPCMN) en la médula ósea, ya que la formación de MN se puede extender a lo largo de un tiempo considerable (Bonassi *et al.*, 2007).

El grado de formación continua de células con MN dependerá de la persistencia del agente inductor, del tipo de lesión inducida sobre el ADN, la combinación de las velocidades de formación y eliminación de aberraciones cromosómicas, y de la velocidad de recuperación del retraso del ciclo celular (Mavournin *et al.*, 1990). Debido al tiempo de transición entre EPC y ENC (aproximadamente 20 h) no cabe esperar incrementos sustanciales en la incidencia de ENC con micronúcleos (ENCMN) luego de 24 h de administrar la sustancia en estudio. La inducción de un efecto citotóxico sobre las células nucleadas precursoras de la médula ósea, causa muerte celular o reducción de la división celular, lo que genera una disminución en la formación de EPC quedando reflejado como un descenso en la relación entre EPC y ENC.

La popularidad de este ensayo es atribuible en gran parte a que el examen de MN es mucho más sencillo y rápido que el examen de aberraciones cromosómicas y requiere un menor nivel de entrenamiento. Asimismo, la capacidad para examinar en un mayor número de células la presencia/ausencia de MN y no de aberraciones cromosómicas, le confiere a este ensayo una mayor potencia estadística y en consecuencia una mayor sensibilidad. También se han desarrollado metodologías experimentales para evaluar la inducción de MN en otros tipos celulares como hepatocitos, células intestinales, etc. No obstante, diferentes variantes e innovaciones técnicas aplicadas sobre la metodología inicialmente propuesta por Schmid (1975) y Heddle (1973) han contribuido en hacer del ensayo de MN en eritrocitos de roedor el ensayo *in vivo* de genotoxicidad por excelencia. Entre estas morfologías, destacan la utilización de sangre periférica como tejido de examen, desarrollada inicialmente en ratón (MacGregor *et al.*, 1980), permitiendo la toma de muestras sin necesidad de sacrificar a los animales; la introducción de la tinción fluorescente con naranja de



acridina (Hayashi *et al.*, 1983; 1990) facilite la identificación de eritrocitos inmaduros en sangre periférica. Junto a la observación microscópica tradicional, la aplicación de técnicas de citometría de flujo utilizando fluorocromos específicos de ADN y/o ARN (Hutter y Stöhr, 1982), y el uso de anticuerpos dirigidos hacia marcadores de superficie específicos, a fin de diferenciar a los eritrocitos inmaduros (Dertinger *et al.*, 1996), ha permitido automatizar y mejorar el rendimiento en el análisis de las muestras.

La aplicación de técnicas de morfometría en los MN (Schmid 1975; Yamamoto y Kikuchi, 1980; Tinwell y Ashby, 1991) o técnicas de citogenética molecular, como en el uso de la tinción con anticuerpos anticinetocoro (Gudi *et al.*, 1990; Miller y Adler, 1990), o la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) con sondas de ADN que hibridan con regiones centroméricas (Miller *et al.*, 1991), han demostrado ser de gran utilidad para establecer el posible origen aneugénico o clastogénico de los MN (Figura N° 2).

#### **2.7.5.- El ensayo citotoxicidad medular en ratones**

Las células de la sangre circulante tienen una vida corta y se renuevan constantemente por la proliferación mitótica de las células madre o "stem cell" localizadas en los órganos hemopoyéticos (Smith, 1996). Las células madre son células que se dividen continuamente y sus células hijas siguen dos destinos: unas permanecen como células madre, manteniendo esta población, y otras se diferencian en otros tipos celulares con características específicas (Junqueira y Carneiro, 1996). Dependiendo de su grado de madurez, las células eritrocíticas se denominan EPC "eritrocito joven" y ENC "eritrocitos maduros o hematíes" (Junqueira y Carneiro, 1996).

Cuando existe la presencia de un agente xenobiótico, este induce un efecto citotóxico sobre las células nucleadas precursoras de la medula ósea, causando muerte celular o reducción de la división celular, causara un descenso en la formación de EPC quedando reflejado en la relación entre EPC/ ENC (Smith, 1996).

### 3.- HIPÓTESIS

Ho = El extracto acuoso del fruto de *Myrciaria dubia* H. B. K. Mc Vaugh “camu camu”, no tiene efecto antimutagénico y citoprotector, contra el daño inducido por el fluoruro de sodio.

H1 = El extracto acuoso del fruto de *Myrciaria dubia* H. B. K. Mc Vaugh “camu camu”, tiene efecto antimutagénico y citoprotector, contra el daño inducido por el fluoruro de sodio.

### 4.-OBJETIVOS

#### 4.1.- Objetivo General:

- Detectar el efecto antimutagénico y citoprotector del extracto acuoso del fruto de *Myrciaria dubia* H. B. K. Mc Vaugh “camu camu”, contra el daño inducido por el fluoruro de sodio sobre el material genético en células eritropoyéticas de la médula ósea de ratón.

#### **4.1.1- Objetivos Específicos:**

- Determinar la frecuencia de micronúcleos en células de la médula ósea de ratón expuesta al fluoruro de sodio usando el ensayo de micronúcleos.
- Determinar el índice de citotoxicidad en células de la médula ósea de ratón expuesta al fluoruro de sodio, utilizando la relación entre eritrocitos policromáticos y normocromáticos.
- Estimar la concentración de extracto acuoso del fruto de *Myrciaria dubia* H. B. K. Mc Vaugh "camu camu", que ejerza el mayor efecto antimutagénico y citoprotector contra el daño inducido por el fluoruro de sodio.

## 5.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1.- Material Biológico:

**5.1.1.- Animales de experimentación:** Se utilizaron 120 ratones *Mus musculus* (60 ♀, 60 ♂) de la cepa albina Swiss Rockefeller de 6 a 10 semanas de edad con pesos de 25 a 35 g, procedentes del Bioterio del Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM. Los ratones fueron mantenidos en condiciones estándar de temperatura, humedad y fotoperiodo (14 y 10 h luz / oscuridad) con alimento balanceado para animales (Purina, Perú), y agua *ad libitum*.

**5.1.2.- Planta a evaluar:** El fruto de *Myrciaria dubia* H. B. K. Mc Vaugh “camu camu”, fue adquirido en un estado inmaduro en el mercado de la ciudad de Pucallpa - Ucayali, donde fue empaquetado para su posterior traslado a la ciudad de Lima. (Fotografía N° 1).

### 5.2.- Material de laboratorio:

**5.2.1.- Equipos:** Balanza analítica (Sartorius), balanza digital (Adam equipment), agitador magnético (Precision científica), potenciómetro digital (Oaklon), pipetas automáticas (Axigen), autoclave vertical (Precision científica), microscopio binocular de campo claro (Carl zeiss jena), microscopio estereoscopio (Bausch & lomb), centrífuga (Precision científica), congeladora horizontal (-25°C) (International), refrigeradora doméstica (GLG), cámara fotográfica digital con adaptador al microscopio (Panasonic), horno de 0 a 300 °C (Adam equipment), horno microondas (Samsung), cámara de bioseguridad (Eaol ambiental), plancha secadora de láminas (Precision científica),

calentador parabólico (Miray), contómetro múltiple (Labolar), computadora PIV (Hewlett-Packard), impresora (Hewlett-Packard), escáner (Epson).

**5.2.2.- Reactivos:** Fluoruro de Sodio Q.P. (Sigma), Ácido ascórbico Q.P. (Carlos Erba), Ciclofosfamida (N,N-bis (2-cloroetil) tetrahidro-2H-1,3,2 oxaza- fosforin-2-amino 2-oxido), Ácido acético glacial, Metanol absoluto (Carlos Erba), Alcohol etílico absoluto, Alcohol corriente 96°, Giemsa (Sigma), Suero albúmina de bovino - BSA (Sigma), Resina Entellan, Buffer fosfato salino, Cloruro de sodio, Agua destilada, Agua desionizada, Aceite de inmersión (Merck).

**5.2.3.- Insumos:** Tubos de ensayo 10 x 100 mm, láminas portaobjetos, laminillas cubre objetos, beakers de 10, 25, 50, 100 y 500 ml, probetas de 10, 50 y 300 ml, pipetas de 3 ml, viales, estuche de disección de 24 piezas; jeringas tuberculina, jeringa de insulina, papel lente.

### **5.3.- Métodos:**

**5.3.1.- Preparación del extracto acuoso del fruto de *Myrciaria dubia* H. B. K. Mc Vaugh “camu camu”.** Extraída la pulpa se dejó secar por un lapso de 24 h a 55°C, posteriormente se pesó y suspendió en un volumen de 100 ml de agua destilada, se llevó a una temperatura de 55° C por 24 h. Enseguida se filtró y el extracto final se guardó en frascos de vidrio de color ámbar, manteniéndose a una temperatura de –20 °C.

**5.3.2.- Tratamiento.** Para cada tratamiento se formaron dos grupos de 10 individuos, siendo uno de cada sexo. Al primer grupo, control negativo (CN) se le suministró intraperitonealmente (ip) agua destilada por un lapso de 10 días; a los grupos TI, TII y TIII (50, 25 y 5 mg/kg de peso corporal) se les dio a beber el extracto acuoso del fruto de “camu camu” por un lapso de 10 días; al TIV se le suministró 25 mg/kg de ASA vía

ip. Además a TI, TII, TIII y TIV al décimo día se le suministró una dosis única de NaF 20 mg/kg peso corporal vía ip, respectivamente. Al control positivo (CP) se le inyectó 125 mg/kg, de ciclofosfamida vía ip.

### **5.3.3.- Determinación de MN**

**5.3.3.1.- Sacrificar a los ratones:** A las 30 horas después de realizada la inoculación con el NaF se sacrificaron los ratones por dislocación cervical.

**5.3.3.2.- Obtención de las células:** Se aislaron las células de la médula ósea del fémur en buffer fosfato salino (PBS) suplementado con BSA al 5 % en un tubo de ensayo de 10 x 100 mm, posteriormente el tubo se centrifugó a 1500 rpm por un lapso de 20 minutos. Se obtuvo una fase sobrenadante que fue descartada y un precipitado de la células sanguínea que fueron resuspendidas en 0,5 ml de PBS suplementado con BSA al 5 %.

**5.3.3.3.- Preparacion del frotis:** Con estas células se realizó frotices en 2 láminas portaobjeto por individuo (Fotografía N° 4, 5). Una vez realizado el frotis, las láminas se dejaron secar en una estufa temperada a 37°C por un lapso de 45 minutos, cada lámina fue rotulada según el tratamiento.

**5.3.3.4.- Fijación, coloración y sellado permanente:** Las láminas porta objetos se fijaron con metanol absoluto a 8 °C por 25 minutos, enseguida las láminas se dejaron secar a temperatura ambiente por un lapso de 1 hora. La coloración se realizó con Giemsa al 2% preparado con PBS pH 7.2, por un tiempo aproximado de 15 minutos. Transcurrido este tiempo las láminas fueron enjuagadas con agua corriente por 1 minuto y después con agua destilada por un lapso de 3 minutos, dejándolas secar en una plancha secadora de láminas por 1 hora (Fotografía N° 8). Las láminas se fijaron permanentemente con bálsamo entellan, para su posterior visualización, análisis y toma de fotografías (Fotografía N° 9).

**5.3.3.5.- Análisis de Micronúcleos.** Se realizó en un microscopio óptico de campo claro Carl Zeiss Jena a un aumento de 1000X. Fue necesario volver a codificar las láminas para hacer un conteo a ciegas de los tratamientos. Se analizó 2000 eritrocitos policromáticos (EPC) por cada individuo y se registró la frecuencia de eritrocitos micronucleados (EPMN) (Fotografía N° 9). Para descartar cualquier error al momento de contar los eritrocitos policromáticos y poder diferenciarlos de artefactos, como los restos de colorantes que pueden precipitar al momento de colorear las láminas y que ocasionalmente pueden interferir al momento de hacer el análisis en el microscopio óptico, se estableció un patrón de análisis de la morfología de los micronúcleos siendo estos redondos y con un diámetro de aproximadamente 1/20 a 1/5 del diámetro de un eritrocito (Schmid, 1975).

**5.3.3.6.- Análisis de Citotoxicidad Medular:** Se volvió a codificar las láminas para hacer un conteo a ciegas de los tratamientos, se analizó 500 eritrocitos EPC y normocromáticos (ENC) por cada individuo, registrándose la relación EPC/ENC, indicadora de citotoxicidad medular (Fotografía N° 9B)

**5.3.3.7.- Análisis Estadístico.** Los datos obtenidos en el estudio fueron procesados para determinar el tipo de distribución mediante el test de *Kolmogorog-Smirnov*. Una vez hecho este análisis, se procedió a comparar las medias con el Test de Tukey con una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ).

## 6.- RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el ensayo *in vivo* de MN en ratones previamente suministrados con el extracto acuoso del fruto de *Myrciaria dubia* H. B. K. Mc Vaugh “camu camu” y ser expuestos a una dosis única de fluoruro de sodio (25 mg/kg de p.c.), son presentados a continuación en tablas y figuras:

### 6.1.- Frecuencia de micronúcleos en ratones machos

En la Tabla N° 1 muestra los resultados obtenidos para la frecuencia de micronucleos, donde se observa que existen diferencias significativas (\*) con un nivel de significancia del 95% ( $p > 0.05$ ) entre los 4 tratamientos para los ratones machos. Se observa que a mayor concentración del extracto se tiene menor frecuencia de MN (TI 3,9 ‰  $\pm$  1,79\*) y el de mayor frecuencia de MN se encontró en el TIII (32 ‰  $\pm$  9,20\*). Clara evidencia que a menor concentración del extracto acuoso de *Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh “camu camu”, mayor es el daño mutagénico.



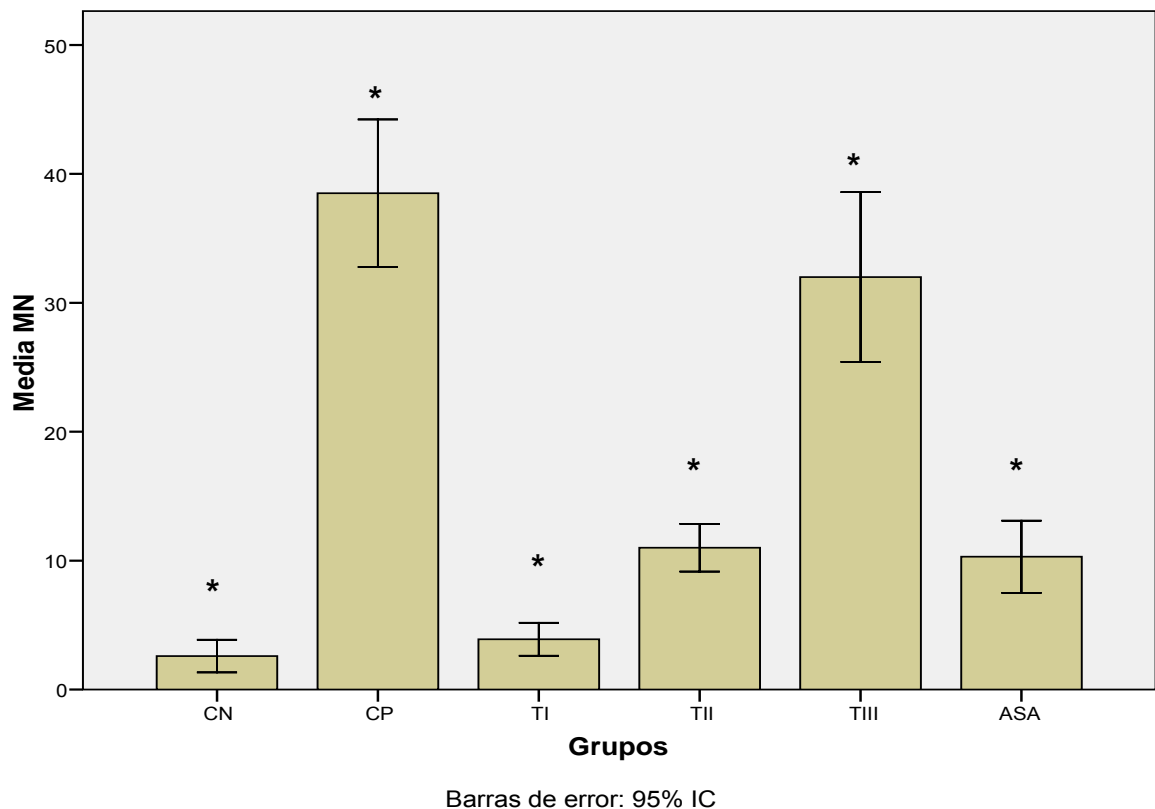
**Tabla Nº 1: Frecuencia de Micronúcleos en ratones**

GRUPO	DOSIS	MN	EPCMN/2000EPC (MEDIA ± SE)
CN	Agua <i>ad libitum</i>	3/4/5/2/1/0/4/3/0/4	3,3 ± 1,77
TI	Camu-camu 50 mg/Kg	5/6/6/2/3/1/6/3/3/4	3,9 ± 1,79*
TII	Camu-camu 25 mg/Kg	9/16/14/9/9/11/8/13/11/10	11 ± 2,58*
TIII	Camu-camu 5 mg/Kg	22/39/14/38/27/41/43/31/29/36	32 ± 9,20*
TIV	ASA 25 mg/Kg	11/6/8/13/17/14/7/9/5/13	10,3 ± 3,91*
CP	Ciclofosfamida 125 mg/Kg	51/39/27/28/38/46/43/37/31/45	38,5 ± 8,00*
TOTAL			16,38 ± 14,86

- Cada tratamiento consta de 10 individuos del sexo masculino.
- CN: Control Negativo
- CP: Control Positivo
- TI: Tratamiento I, TII: Tratamiento II, TIII: Tratamiento III, TIV: Tratamiento IV,
- MN: Micronúcleos, EPCMN: Eritrocito Policromático Micronucleado, ENC: Eritrocito Normocromático.
- Prueba Paramétrica de Tukey. \* diferencia significativa  $p < 0.05$ ; entre CN y cada grupo de tratamiento.

En el grafico Nº 1 se muestra la comparación entre la frecuencia MN en los ratones machos donde se observa una tendencia, que a mayor concentración del extracto de “camu camu”; el efecto antimutagénico es más eficiente. Existiendo diferencias significativas (\*) entre los grupos tratados y los controles, con un nivel de significancia del 95% ( $p > 0.05$ )

**Gráfico N° 1: Comparacion entre la Frecuencia de Micronúcleos en ratones machos tratados con diferentes concentraciones de “camu camu”.**



## 6.2.- Frecuencia de micronúcleos en ratones hembras.

Resultados similares se observa, para los tratamientos utilizando ratones hembras. En la Tabla N° 2 se verifica que a mayor concentración del extracto acuoso del fruto de “camu camu” TI = 50 mg/kg pc, menor es la frecuencia de MN ( $3,1 \% \pm 1,79^*$ ), mientras que a menor concentración del extracto, TIII = 5 mg/kg pc., se obtiene un valor de  $26,8\% \pm 6,10^*$ , comparándolos con el control negativo y positivo respectivamente con una significancia del 95% ( $p < 0,05$ ).

GRUPO	DOSIS	MN	EPCMN/2000EPC (MEDIA ± SE)
CN	Agua <i>ad libitum</i>	2/3/4/1/0/1/3/2/1/3	2,9 ± 1,24
TI	Camu-camu 50 mg/Kg	4/3/3/7/1/4/2/4/2/1/3	3,1 ± 1,79*
TII	Camu-camu 25 mg/Kg	11/10/9/8/10/7/6/11/12/8	9,2 ± 1,93*
TIII	Camu-camu 5 mg/Kg	19/24/17/31/25/33/28/36/24/31	26,8 ± 6,10*
TIV	ASA 25 mg/Kg	11/7/16/14/9/13/14/7/15/17	12,3 ± 3,62*
CP	Ciclofosfamida 125 mg/Kg	49/33/37/31/29/24/41/33/28/24	32,9 ± 7,76*
TOTAL			14,38 ± 12,46

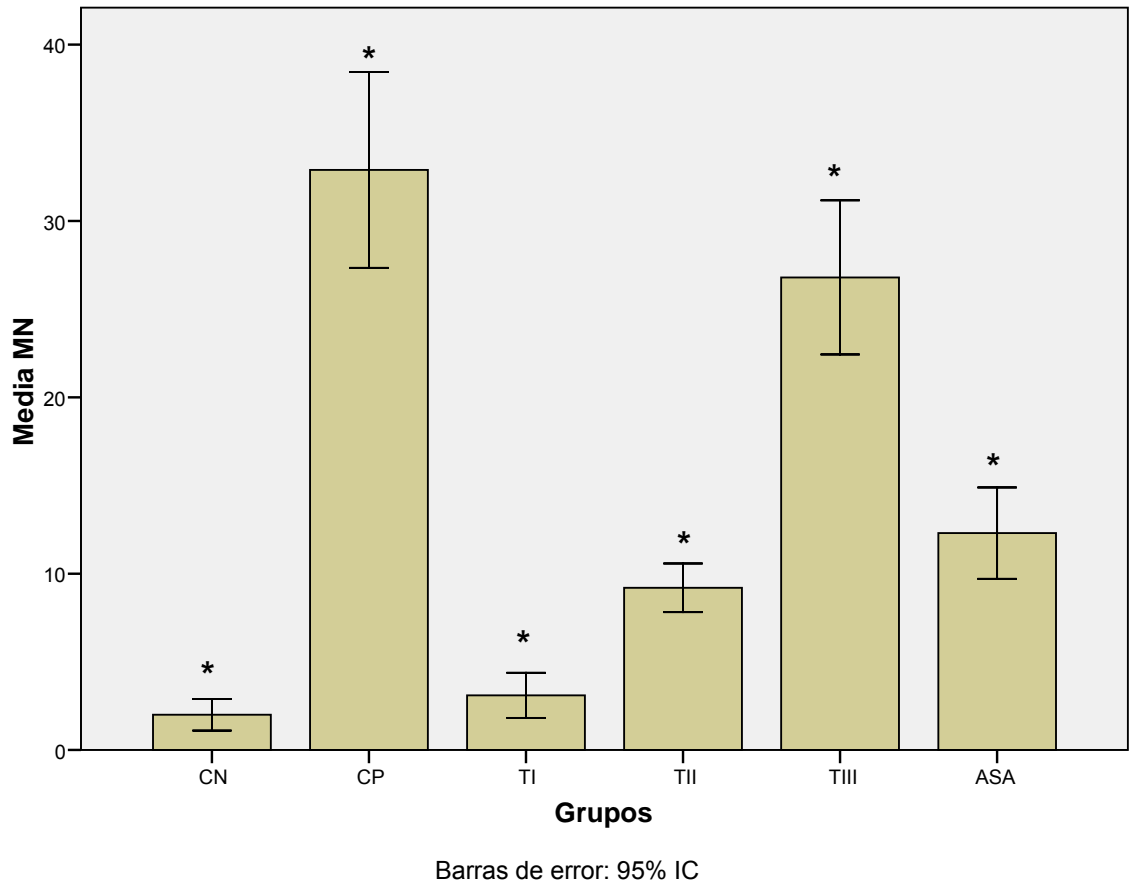
**Tabla Nº 2: Frecuencias de MN en Ratones Hembras**

- Cada tratamiento consta de 10 individuos del sexo masculino.
- CN: Control Negativo
- CP: Control Positivo
- TI: Tratamiento I, TII: Tratamiento II, TIII: Tratamiento III, TIV: Tratamiento IV,
- MN: Micronúcleos, EPCMN: Eritrocito Policromático Micronucleado, ENC: Eritrocito Normocromático.
- Prueba Paramétrica de Tukey. \* diferencia significativa  $p < 0.05$ ; entre CN y cada grupo de tratamiento.

Mediante un gráfico de barras (gráfico Nº 2) se muestra la frecuencia de MN en los ratones hembras, evidenciándose que a mayor concentración del extracto (50 mg/Kg) el efecto antimutagénico del “camu camu” es mayor y los resultados se asemejan a los obtenidos para la frecuencia de MN en el grupo control negativo. Se deduce que a menor concentración del extracto los resultados tienden a igualar a los obtenidos con el control positivo (32,9 % ± 7,76\*). Existiendo diferencias significativas (\*) con un nivel de significancia del 95% ( $p > 0.05$ )

**Gráfico N° 2: Comparacion entre la Frecuencia de Micronúcleos en ratones**

**hembras**



### 6.3.- Índice de Citotoxicidad en ratones.

Para obtener el índice de citotoxicidad medular se utilizó la relación EPC/ENC. Con este índice se comprobó que hubo un efecto citoprotector en las células de la medula ósea de ratón para el tratamiento que posee la mayor concentración del extracto del fruto del “camu camu”.

**6.3.1 Índice de citotoxicidad en ratones machos:** En la Tabla N° 3 se muestran los valores promedios para los ratones machos TI =  $1,59 \pm 0,42^*$ ; TII =  $0,91 \pm 0,23^*$ ; TIII =  $0,81 \pm 0,21^*$  y para el TIV =  $1,37 \pm 0,15^*$  comparándolos con el control negativo y positivo respectivamente con una significancia del 95% (\*  $p < 0,05$ ). Es así que a mayor concentración del extracto acuso del fruto del “camu camu”, los valores

obtenidos en los diferentes tratamientos se acercan a los valores observados en el control negativo.

**Tabla Nº 3: Índice de Citotoxicidad en Ratones machos**

GRUPO	DOSIS	EPC	ENC	EPC/ENC (MEDIA ± SE)
CN	Agua <i>ad libitum</i>	381/415/395/403/411 /331/395/321/359/379	119/85/105/97/89/169 /105/179/141/121	1,98 ± 1,05
TI	Camu-camu 50 mg/Kg	301/299/278/341/355 /306/289/244/311/307	199/201/222/159/145 /194/211/256/189/193	1,59 ± 0,42*
TII	Camu-camu 25 mg/Kg	156/285/225/241/227 /262/233/254/214/256	344/215/275/259/273 /238/267/246/286/244	0,91 ± 0,23*
TIII	Camu-camu 5 mg/Kg	199/241/211/218/223 /203/291/211/197/215	301/259/289/282/277 /297/209/289/303/285	0,81 ± 0,21*
TIV	ASA 25 mg/Kg	287/271/298/310/301 /300/277/268/291/288	213/229/202/190/199 /200/223/232/209/212	1,37 ± 0,15*
CP	Ciclofosfamida 125 mg/Kg	139/ 101/156/189/198 /234/182/181/297/174	361/399/344/311/302 /266/318/319/203/326	0,63 ± 0,33*
TOTAL				1,45 ± 1,04

- Cada tratamiento consta de 10 individuos del sexo femenino.
- CN: Control Negativo
- CP: Control Positivo
- TI: Tratamiento I, TII: Tratamiento II, TIII: Tratamiento III, TIV: Tratamiento IV,
- MN: Micronúcleos, EPCMN: Eritrocito Policromático Micronucleado, ENC: Eritrocito Normocromático.
- Prueba Paramétrica de Tukey. \* diferencia significativa  $p < 0.05$ ; entre CN y cada grupo de tratamiento.

**6.3.2 Índice de citotoxicidad en ratones hembras:** Los valores obtenidos en los diferentes tratamientos se observan en la Tabla Nº 4, teniendo los siguientes valores; TI = 1,95 ± 0,79\*; TII = 1,33 ± 0,10\*; TIII = 0,70 ± 0,23\* y para el TIV = 1,27 ± 0,17\*. Todos estos resultados comparados con el control negativo y positivo respectivamente con una significancia del 95% (\*  $p < 0,05$ ).

**Tabla Nº 4: Índice de Citotoxicidad en Ratones hembras**

GRUPO	DOSIS	EPC	ENC	EPC/ENC (MEDIA ± SE)
CN	Agua <i>ad libitum</i>	397/415/401/388/392 /337/382/401/355/367	103/85/99/112/108 /163/118/99/145/133	2,1 ± 0,84
TI	Camu-camu 50 mg/Kg	301/299/287/313/345 /401/297/347/317/321	199/201/213/187/155 /99/203/153/183/179	1,95 ± 0,79*
TII	Camu-camu 25 mg/Kg	278/291/287/274/268 /297/289/299/284/291	222/209/213/226/232 /203/211/201/216/209	1,33 ± 0,10*
TIII	Camu-camu 5 mg/Kg	144/267/144/169/213 /245/235/204/201/198	356/233/356/331/287 /255/265/296/299/302	0,70 ± 0,23*
TIV (ASA)	ASA 25 mg/Kg	274/281/287/241/256 /285/297/286/299/282	226/219/213/259/244 /215/203/214/201/218	1,27 ± 0,17*
CP	Ciclofosfamida 125 mg/Kg	121/98/144/178/199 /201/233/198/122/197	379/402/356/322/301 /299/267/302/378/303	0,53 ± 0,20*
TOTAL				1,54 ± 1,08

- Cada tratamiento consta de 10 individuos del sexo femenino.
- CN: Control Negativo
- CP: Control Positivo
- TI: Tratamiento I, TII: Tratamiento II, TIII: Tratamiento III, TIV: Tratamiento IV,
- MN: Micronúcleos, EPCMN: Eritrocito Policromático Micronucleado, ENC: Eritrocito Normocromático.
- Prueba Paramétrica de Tukey. \* diferencia significativa  $p < 0.05$ ; entre CN y cada grupo de tratamiento.

## 7.- DISCUSIÓN

La presencia de MN en células somáticas (linfocitos, células epiteliales bucales, nasales, uroteliales, etc.) se emplea de forma habitual como biomarcador de daño y estabilidad cromosómica en trabajos de mutagenicidad en poblaciones humanas, asimismo hay evidencias que indican que la frecuencia de MN también puede ser un biomarcador predictivo del riesgo de padecer cáncer (Chang *et al.*, 1997; Fenech 2002). Esta observación apoya la hipótesis de que la extensión del daño genético observado en los linfocitos medulares, es un reflejo de los sucesos carcinogénicos iniciales mediados por factores genéticos, dietarios o ambientales comunes en el tejido diana (Bonassi *et al.*, 2007).

La importancia que tiene la formación de un MN en una célula, reside en las posibles consecuencias adversas que puede provocar en ésta. Una de ellas es la inclusión de los genes supresores de tumores en los MN, pudiendo ocasionar la transformación celular, siendo este un paso indefectible para la carcinogénesis. Varias observaciones apoyan la existencia de una asociación entre la inducción de MN y el desarrollo de cáncer (Fenech *et al.*, 1999, Fenech, 2002). La alta frecuencia de MN detectados en tejidos precancerosos, la correlación observada entre frecuencia de MN y transformación maligna de las células sugieren que la formación de MN constituye un proceso relevante en la carcinogénesis (Chang *et al.*, 1997; Stopper y Müller, 1997).

A los experimentos *in vivo* como el ensayo de MN en médula ósea de ratón se les atribuye una alta especificidad de encontrar una relación entre el daño al ADN y las sustancias xenobióticas. (Fenech, 2002). Esta alta especificidad y la mayor proximidad del modelo experimental *in vivo*, hace que se asemeje a una situación real en humanos, la obtención de un resultado positivo en este ensayo tiene una especial

relevancia desde el punto de vista de la evaluación de riesgo mutagénico. (Matter y Schmid, 1971; Vijayalaxmi y Venu, 1999; Fenech, 2002).

La frecuencia de MN en ratones machos observados en la Tabla N° 1, muestra que el extracto acuoso del fruto del “camu camu” tiene un efecto antimutagénico; evidenciándose que el tratamiento con la mayor concentración del extracto (TI = 50 mg/kg pc.) posee la menor frecuencia de MN  $3,9 \% \pm 1,79^*$  al compararlo con los demás tratamientos (TII =  $11 \% \pm 2,58^*$ ; TIII =  $32 \% \pm 9,20^*$  y el TIV =  $10,3 \pm 3,91$ ). Mediante el análisis estadístico de Tuckey, se encontró diferencias significativas entre las diferentes concentraciones utilizadas y su respectivo control negativo, con un nivel de significancia del 95% ( $p > 0.05$ ). Este resultado es debido a la alta concentración de antioxidantes presentes en este fruto, como es el ASA, que posee alrededor de 2,780 mg/100 g de pulpa de “camu camu” (Ascuña y Mourao 1997; Justi *et al.*, 2000) y que funciona como supresor de los EROs e inhibidores enzimáticos (Velioglu *et al.*, 1998; Wang y Lim, 2000).

Los valores de la frecuencia de MN obtenidos en el TIV =  $10,3 \pm 3,91$  que contiene 25 mg/kg p.c de ASA, es similar a la obtenida en el TII =  $11 \% \pm 2,58^*$ , el efecto antimutagénico del ASA en TIV, no es tan evidente como el producido por el extracto acuoso del fruto de “camu camu”, debido a que la presencia de Beta-caroteno, calcio, hierro, niacina, fósforo, proteínas, riblofavina y tiamina que están presentes en la pulpa y en la cáscara del fruto (Zapata y Dufour, 1993), hacen que se potencialice su acción antimutagénica en comparación a la acción al ASA. No solo esta propiedad antimutagénica se le atribuye al camu-camu, sino que este principio activo es atribuido a una variedad de extractos de origen vegetal como el romero, salvia, cáscara de cacao, avena, té, aceitunas, ajo, jengibre, cebolla roja, uvas, cáscara de manzanas, trigo, nuez moscada, clavo, orégano, hoja de la semilla de mostaza, maní, corteza de abedul, las vainas de algarrobo, linaza, brotes de trébol, mango, vainilla y semillas tropicales (Velioglu *et al.*, 1998; Wang y Lim, 2000).



Los resultados obtenidos para los ratones hembras en la frecuencia de MN son similares a los datos obtenidos para los ratones machos. Se encontró que hubo una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos al ser comparados con sus respectivos controles negativo y positivo respectivamente con una significancia del 95% ( $p < 0,05$ ). La evaluación de los componentes nutricionales del fruto de *Myrciaria dubia* H. B. K. Mc Vaugh "camu camu", realizado por Justi K. y colaboradores (2000) resalta la superioridad de ASA conjuntamente con los microcomponentes o fitonutrientes conocidos previamente como componentes no-nutricionales o secundarios, como los potentes antioxidantes que están presentes en este fruto al ser comparados con otros productos naturales de la amazonia peruana (Wang *et al.*, 1996; Moure *et al.*, 2001), por esta razón las plantas son consideradas la base de toda terapia de medicina tradicional (Zheng y Wang, 2001). A inicios de los años 90 se descubrió el efecto positivo de los antioxidantes en frutas y verduras (Ames *et al.*, 1993; Hertog *et al.*, 1992, 1993, 1995). En general, es por su contenido de vitamina C,  $\beta$ -caroteno, vitamina E, minerales, flavonoides y otros compuestos polifenólicos (Aruoma, 1994; Hollman y Katan, 1999; Pryor, 2000) que las fuentes vegetales siguen siendo los suplementos de interés en la medicina natural.

Los controles positivo con ciclofosfamida, inyectado vía i.p. a los ratones tratados en este estudio, a una concentración de 125 mg/kg, muestran en los frotis extraídos, la inducción de EPCMN, arrojando una frecuencia de  $38,5 \pm 8,00^*$  y  $32,9 \pm 7,76^*$  para machos y hembras respectivamente. En este sentido en el control positivo la ciclofosfamida ha actuado como un buen inductor para corroborar los resultados obtenidos detectándose las altas frecuencias de micronúcleos en las células de medula ósea de ratón, debido al daño genotóxico producido por esta droga (Kola *et al.*, 1986; Majone *et al.* 1987). La acción de la ciclofosfamida es metilar el ADN mediado por la acción de los EROs produciendo la ruptura de las cromátides, es por esta razón que se puede observar una alta frecuencia de MN en los controles positivos (Tabla N°

1, 2, 3 y 4). También puede inhibir la síntesis de proteínas, causando mutaciones en la sustitución de bases, o impidiendo la replicación y reparación del ADN (Kola *et al.*, 1986).

El daño mutagénico producido por altas concentraciones del fluoruro de sodio causa efectos tóxicos en humanos, produciendo fluorosis dental y esquelética (Shivarajashankara *et al.*, 2001). Es por esta razón que la intoxicación por fluoruros en general, ha sido asociada con la depleción de la producción de energía a través de la inhibición del ciclo de Krebs, la atrofia muscular, toxicidad hepática, renal y testicular; asimismo, ocasiona la disminución de la fertilidad, bajo porcentaje de nacimiento, deflagelación espermática en hombres y animales de experimentación y bajo conteo de espermatozoides (Ghosh *et al.*, 2002). Una de las consecuencias del estrés oxidativo producido por los fluoruros es la peroxidación lipídica, debido a que los productos derivados en este proceso actúan con el ADN y se tornan potencialmente mutagénicos. Los radicales libres producidos pueden reaccionar espontáneamente con los centros nucleofílicos en la célula o unirse a los ácidos nucleicos (ADN y ARN). Esta reacción puede ocasionar citotoxicidad, alergia y/o carcinogénesis (Tsutsui *et al.*, 1984).

Adicionalmente a la evidencia que el extracto acuoso del fruto de *Myrciaria dubia* H. B. K. Mc Vaugh “camu camu”, tiene la capacidad de proteger al eritroblasto presente en la medula ósea del ratón contra el daño mutagénico producido por el fluoruro de sodio, también se le puede atribuir un efecto citoprotector a través del Índice de Citotoxicidad (PCE/NCE), debido a que no existe diferencia significativa entre los tratamientos en ratones machos (TI =  $1,59 \pm 0,42^*$ ; TII =  $0,91 \pm 0,23^*$ ; TIII =  $0,81 \pm 0,21^*$  y para el TIV =  $1,37 \pm 0,15^*$ ) Sin embargo, se observa que a mayor concentración del extracto de “camu camu” (TI = 50 mg/kg) el efecto citoprotector se hace más evidente por las propiedades antioxidantes del extracto, que son importantes en la protección contra el daño oxidativo celular (Wang C, 2000). El daño

citotóxico producido por el fluoruro de sodio a una concentración de 20 mg/kg., se puede observar cuando se disminuye la concentración del extracto se evidencia la diferencia significativa entre ellos al comparar estos resultados con los demás tratamientos, con lo que respecta a los valores encontrados para los ratones hembras (Tabla N° 4), hay resultados similares corroborándose que a mayor concentración del extracto acuoso del fruto de “camu camu”, menor es el daño citotóxico producido por el fluoruro de sodio.

Por otro lado, el efecto citoprotector que ofrece el extracto acuoso del fruto de *Myrciaria dubia* H. B. K. Mc Vaugh “camu camu”, se puede conferir a la pigmentación que tiene el fruto. Esto es debido a las antocianinas que son las responsables de los diferentes colores que pueden optar estos frutos: rojo, azul y morado. Las antocianinas poseen la propiedad de permanecer intactas al pasar del tubo digestivo al sistema circulatorio en los mamíferos (Miyazawa *et al.*, 1999). Así como las antocianinas, los flavonoides tienen propiedades de capturar los radicales libres (Saint-Crick de Gaulejac y Vivas, 1999), al intercalarse en la hebra de ADN, reduciendo la oxidación (Wang C. 2000).

El efecto antimutagénico y citoprotector principalmente se debió a la elevada concentración de ASA en el extracto, esta sustancia previene el daño molecular a las diferentes estructuras celulares (Aruoma,. 1994; Hollman, Katan, 1999; Pryor, 2000). Para lograrlo, el ASA y los antioxidantes en general; ceden un electrón a los radicales libres, con lo cual desactivan el proceso (Wang C, 2000).

Los antioxidantes del extracto acuoso del fruto de *Myrciaria dubia* H. B. K. Mc Vaugh “camu camu”, son compuestos, que se pueden ingerir a través de la dieta, y así disminuyen los efectos adversos de las especies reactivas del oxígeno en el organismo, tornándose en piezas importantes en la dieta para el control de

enfermedades crónicas. Estudios epidemiológicos demuestran que individuos con una ingesta elevada de antioxidantes naturales tienen un menor riesgo de contraer una serie de enfermedades crónicas, incluyendo enfermedades oculares, cardíacas, cáncer y neurodegenerativas, constituyendo así como una herramienta de gran significado en medicina preventiva (Jacob y Sotoudeh, 2002).

## 8.- CONCLUSIONES

En base a los antecedentes y resultados aportados en el siguiente estudio, se obtienen las siguientes conclusiones:

- Se comprobó mediante el ensayo *in vivo* de micronúcleos en médula ósea de ratón, que a mayor concentración (TI = 50 mg/kg) del extracto acuoso del fruto de *Myrciaria dubia* H. B. K. Mc Vaugh “camu camu”, posee un efecto antimutagénico contra el daño producido por el fluoruro de sodio.
- Cuando se suministra anticipadamente el extracto acuoso del fruto de *Myrciaria dubia* H. B. K. Mc Vaugh “camu camu” a una concentración de 50 mg/kg, se tiene un efecto citoprotector en las células de médula ósea de ratón; frente al daño inducido por el fluoruro de sodio.
- El extracto acuoso del fruto de *Myrciaria dubia* H. B. K. Mc Vaugh “camu camu”, posee un efecto antimutagénico y citoprotector a la acción mutagénica del fluoruro de sodio evaluado en ratones de ambos sexos.

## 9.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- **American Dietetic Association.** The impact of fluoride on health. *J Am Diet Assoc*, 2000, vol. 100, p. 1208-1213.
- **Atúncar Guzman, Miguel.** “Concentración de fluoruros contenidos en los dentífricos en función a la temperatura”. Asesor: Espinoza Escajadillo, Sofia. Tesis Título Profesional. UNMSM, EAP Odontología, Lima, 2002.
- **Afag F, Mukhtar H.** Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways. *J Photochem. Photobiol. B* 2001; 63: 61- 69.
- **Albertini, R. J. et al.,** IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat. Res.*, 2000, 463, 111–172.
- **Alberts, Bruce, et al.** *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York: Garland Publishing, 2000.
- **Ames, B. M., M. K. Shigenaga, and T. M. Hagen.** Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. of the National Academy of Sci. U.S.A.* 1993, vol. 90, p. 7915-7922.
- **Aruoma O.I.** Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants, *Food Chem. Toxicol.* 1994, vol. 32, p. 671–683.
- **Ascuña Y., Lira J., Mourao P. 1997.** Proyecto de pre-factibilidad para la producción de pulpa de camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc. Vaugh) en Pucallpa. Tesis de Título Profesional. UNALM, EAP Ingeniería Forestal. Lima.
- **Auerbach C, Kilbey EJ.** Mutation in Eukariotes. En: *Ann. Rev. Genet.* 1971; 5: 163 - 218.
- **Auerbach, C. and Robson, J. M.** Chemical production of mutations. *Nature*, 1946, 157, 302.

- **Balz F.** "Natural Antioxidants en Human Health and Disease". New York: Academic Press. 1994. Inc. 290pp ISBN: 0-88167-974-7
- **Bartsch, H., Nair, J. and Owen, R. W.** Dietary polyunsaturated fatty acids and cancer of the breast and colorectum: Emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis*, 1999, 20, 2209–2218.
- **Beinlich AD., Brun LR., Rigalli A., Puche RC.** Intestinal absorption of disodium monofluorophosphate in the rat as affected by concurrent administration of calcium. *Arzneimittelforschung*, 2003, vol. 53, p. 584-9.
- **Beltarn ED and Burt B.** The pre and posteruptive effects of fluoride in the caries decline. *J Public Health Dent*. 1988, vol. 48, n° 4, p. 233-240.
- **Bonassi S., Znaor A., Ceppi M., Lando C., Chang W. P., Holland N., Kirsch-Volders M., Zeiger E., Ban S., Barale R., Bigatti M. P., Bolognesi C., Cebulska-Wasilewska A., Fabianova E., Fucic A., Hagmar L., Joksic G., Martelli A., Migliore L., Mirkova E., Scarfi M. R., Zijno A., Norppa H., Fenech M.** An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*. 2007, vol. 28, p. 625-631.
- **Browne D, Whelton H, O'Mullane D.** Fluoride metabolism and fluorosis. *J Dent*. 2005, vol. 33, n° 3, p.177 - 186.
- **Brusick D.** Screening chemicals for genotoxic properties Pp. 79-120. En: Brusick, D, Principles of genetic toxicology, 2th Edition, Plenum Press. Nueva York y Londres1987.
- **Brusick, D.** Principles of genetic toxicology. *Plenum Press*, 1980; XIX - 279 pp.
- **Burckhardt, D., G. Couturier.** Biology and taxonomy of Tuthillia cognata (Homoptera: Psylloidea), a pest on *Myrciaria dubia* (Myrtaceae). *Annis Soc. Ent. Fr.* 1988, vol. 24, n° 3, p. 257-261.

- **Burt BA, Eklund SA.** Dentistry, dental practice, and the community. 4th ed. Philadelphia, MO: Elsevier Saunders; 1992.
- **Burt BA.** The case of eliminating the use of dietary fluoride supplements for young children. *J Public Health Dent.* 1999, vol. 59, p. 269-274.
- **Calabrese E. J., Baldwin L. A.** Toxicology rethinks its central belief. *Nature* 2003; 421, 691- 692.
- **Carlton RJ.** Review of the 2006 United States National Research Council Report: Fluoride in drinking water. *Fluoride*, 2006, vol. 39, p. 163-172.
- **Chaleil D, Mauras Y, Allain P.** Oral pharmacokinetics of an enteric coated sodium fluoride preparation. *Trace Elem Med*, 1986, vol. 3, p. 11-13.
- **Chang W. P., Hwang B. F., Wang D., Wang J. D.** Cytogenetic effect of chronic lowdose, low-dose-rate gamma-radiation in residents of irradiated buildings. *Lancet*, 1997, vol. 350, p. 330-333.
- **Chatterjee I.B, Mukhopadhyay C.K, Ghosh M.K.** Vitamin C: a potential savior against free radical induced oxidative damage. *Current Science*, 1995, vol. 69, nº 9, p. 747 – 751.
- **Chávez F., Wanders B.** "Camu Camu" en "Selected species and strategies to enhance income generation from Amazonian forests". Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rome, May 1993. [http://www.fao.org/documents/show\\_cdr.asp?url\\_file=/docrep/v0784e/v0784e00.htm](http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/v0784e/v0784e00.htm).
- **Clydesdale G J, Dandie G W, Muller H K.** Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunol Cell Biol* 2001; 79: 547-568.
- **Collazos C.** Composición química de alimentos de mayor consumo en el Perú. 6ª edición. Lima: MINSA; 1993. p. 34.



- **Craig GC.** Fluorides and the prevention of dental decay: a statement from the Representative Board of the British Dental Association. *Br Dent J.*, 2000, vol. 188, n° 12, p. 654.
- **Croce CM.** Oncogenes and cancer. *N Engl J Med.* 2008; 31; 358(5):502-11.
- **Cruz-Bustillo Clarens D.** Molecular genetics of colorectal cancer. *Rev Esp Enferm Dig* 2004; 96:48-59.
- **De Flora S, Izzotti A, D'Agostini F, Balansky R.M, Noonan D, Albin A.** Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases. *Mutation Research* 2001; 480:19-22.
- **De Flora S.** Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res*, 1997; 402:151-158.
- **De Flora S.** Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res.* 1998; 402:151-158.
- **De Gruijl R R.** Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation. *Skin Pharmacol Appl SkinPhysiol* 2002;15: 316-320.
- **Degterev A , Yuan J.** Expansion and evolution of cell death programs. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2008; 9: 378-90.
- **Dertinger S. D., Torous D. K., Tometsko K. R.** Simple and reliable enumeration of micronucleated reticulocytes with a single-laser flow cytometer. *Mutat. Res*, 1996, vol.. 371, p. 283-292.
- **Emerton L.** Conferencia "Impactos económicos para la conservación de La biodiversidad". Universidad del Pacífico. Colegio de Economistas. Proyecto FANPE – GTZ, IUCN. Lima, 2000.
- **Erickson R. P.** Somatic gene mutation and human disease other than cancer. *Mutat. Res.* 2003: 543, 125-136.
- **Ericsson Y., Forsman B.** Fluoride retained from mouthrinses and dentifrices in preschool children. *Caries Res*, 1969, vol. 3, p. 290-299.

- **Fabia, J. & T. Thuy.** Occupation of father at time of birth of children dying of malignant diseases. *Br. J. Prev. Soc. Med.* 1974;28: 98-100.
- **Fejerskov O, Richards A., DenBesten P.** The effect of fluoride on tooth mineralization. In: *Fluoride in dentistry*. Fejerskov O, Ekstrand J, Burt B, editors. Copenhagen: Munksgaard, 1996, pp. 112-146.
- **Fenech M.** Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discov*, 2002, vol. 7, p. 1128-1137.
- **Fenech M., Holland N., Chang W. P., Zeiger E., Bonassi S.** The HUMAN MicroNucleus Project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat. Res*, 1999, vol. 428, p. 271-283.
- **Ferreira, R.** Camu camu, nueva fuente nacional de vitamina C. *En: Bol. Exp. Agropecuaria*, 1959, vol. 7, nº 4, p. 28.
- **Fluoride recommendations work group.** Recommendations for Using Fluoride to Prevent and Control Dental Caries in the United States. *MMWR*. 2001, Vol. 50, No17. p. 14.
- **Friedberg EC, Walker GC and Siede W.** In *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM Press, Washington, DC, 1995; pp. 453–455.
- **Ghaskadbi S, Vaidya V.G.** *In vivo* antimutagenic effect of ascorbic acid against the mutagenicity of the common antiameobic drug diiodohydroxyquinoline. *Mutation Res*, 1989, vol. 222, p. 219 – 222.
- **Ghosh D, Das Sarkar S, Maiti R, Jana D, Das UB.** Testicular Toxicity in sodium fluoride treated rats: association with oxidative stress. *Reprod Toxicol*, 2002, vol. 16, p. 385-90.
- **Gochfeld, M., B. D. Goldstein.** Lessons in Environmental Health in the Twentieth Century, *Annual Review of Public Health*, 1999, vol. 20, Palo Alto, California.

- **Griffiths, A.J.F.; Wessler, S.R.; Lewontin, R.C. y Carroll, S.B.** Genética. 9ª edición. McGraw-Hill. Interamericana. Madrid. 2008
- **Gudi R., Sandhu S. S., Athwal R. S.** Kinetochore identification in micronuclei in mouse bone-marrow erythrocytes: an assay for the detection of aneuploidy-inducing agents. *Mutat. Res*, 1990, vol. 234, p. 263-268.
- **Gutiérrez-Salinas J, Morales-González JA.** Production of free radicals derived from oxygen and hepatocyte damage. *Med Int Mex*, 2004, vol 20, p. 287-295.
- **Harper JW, Elledge SJ.** Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr Opin Gen Develop* 1996; 6: 56-64.
- **Hayashi M., Morita T., Kodama Y., Sofuni T., Ishidate M. Jr.** The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res.*, 1990, vol. 245, p. 245-249.
- **Hayashi M., Sofuni T., Ishidate M. Jr.** An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutat. Res.*, 1983, vol. 120, p. 241-247.
- **Heddle J. A.** A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat. Res.*, 1973, vol. 18, p. 187-190.
- **Herazo Acuña, Benjamin.** *Cremas Dentales*. Ediciones ECOE 1º edición Bogota, 1994. 2- 31 p.
- **Hertog, M. G. L., Hollman P. C. H, Katan M. B.** Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *J. Agric. Food Chem*, 1992, vol. 40, p. 2379-2383.
- **Hertog, M. G. L., Kromhout D., Aravanis C..** Flavonoid intake and long-term risk of coronary-heart-disease and cáncer in the 7 countries study. *Arch. Internal Medicine*, 1995, vol. 155, p. 381-386.

- **Hertog, M. G. L., Feskens E. J., Hollman P. C. H.** Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet*, 1993, vol. 342, p. 1007-1011.
- **Hidaro S, Ando M.** Apoptotic cell death following exposure to fluoride in rat alveolar macrophages. *Arch Toxicol*, 1996, vol. 70, p. 249-251.
- **Hininger I, Waters R, Osman M, Garrel C, Fernholz K, Roussel AM, Anderson RA.** Acute prooxidant effects of vitamin C in EDTA chelation therapy and long-term antioxidant benefits of therapy. *Free Radic Biol Med*. 2005, vol. 38, p.1565-70.
- **Hoda Q, Sinha S.P.** Vitamin – C mediated minimisation of rogor induced genotoxicity. *Mutation Res*, 1993, vol. 229, p. 29 - 36.
- **Hoffmann G R.** Genetic toxicology. En: Toxicology. The basic science of poisons, 5th Edition. Ed. Casarett and Doull's. McGraw-Lill. Health Professions Divisions. New York. 1996.
- **Holland RI.** Fluoride inhibition of protein and DNA synthesis in cells in vitro. *Acta Pharmacol Toxicol*, 1979, vol. 45, p. 96-101.
- **Hollman P.C.H., Katan M.B.** Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem. Toxicol*, 1999, vol. 37, p. 937–942.
- **Holly, A., D. Aston & A.D. Khristiansen.** Ewing's bone sarcoma, paternal occupational exposure and other factors. *A. J. Epidemiol* 1992;135: 122-129.
- **Humfrey C. D.** Recent developments in the risk assessment of potentially genotoxic impurities in pharmaceutical drug substances. *Toxicol. Sci*. 2007; 100, 24-28.
- **Hutter K. J. Stöhr M.** Rapid detection of mutagen induced micronucleated erythrocytes by flow cytometry. *Histochemistry*, 1982, vol. 75, p. 353-362.
- **ICH, Topic S2B,** Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of

- **International Union of Pure & Applied Chemistry.** Commission on the Nomenclature of Inorganic Chemistry, Nomenclature of Inorganic Chemistry Recommendations 1990, Ed. G.J. Leigh, Blackwell Science, Oxford.
- **Jacob RA., and Sotoudeh G.** Vitamin C function and status in chronic disease. *Nutr Clin Care*, 2002, vol. 5, p. 66-74.
- **Justi, K. C., Visentainer, J. V., De Souza, N.E., Matsushita, M.** Nutritional composition and vitamin C stability in stored camu-camu (*Myrciaria dubia*) pulp. *Arch. Latinoam. Nutr. Dec.* 2000, vol. 50, nº 4, p. 405-408.
- **Kada T, Tadashi I, Ohta I, Shirasu T.** Antimutagens and their modes of action. *Basic Life Sciences* 1987; 39:181-192.
- **Kada T.** Environmental desmutagens and antimutagenic agents. *Environ. Mut* 1984; 240:135-151
- **Khan P.K, Sinha S.P.** Antimutagenic efficacy of higher doses of vitamin – C. *Mutation Res*, 1993, vol. 298, p. 157 – 161.
- **Kojima h, Konishi H, Kuroda Y.** Effects of L- ascorbic acid on the mutagenicity of ethylmethane sulfonate in cultured mammalian cells. *Mutation Res*, 1992, vol. 266, p. 85 – 91.
- **Kola I, Folb P., Parker M.** Maternal administration of cyclophosphamide induces chromosomal aberrations and inhibits cell number, histone synthesis, and DNA synthesis in preimplantation mouse embryos. *Teratogenicity, Carcinogenicity and Mutagenicity*, 1986, vol. 6, p. 115-127.
- **Koppe C.** A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomicina c and various pesticides. *Mutat. Res.* 2002, vol. 518, p. 145-150
- **Kozmin S G, Pavlov Y I, Kunkel T A, Sage E.** Roles of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerases Pol $\eta$  and Pol $\zeta$  in response to irradiation by simulated sunlight. *Nucleic Acids Research* 2003; 31(15): 4541-4552.

- **Kramer P. J.** Genetic toxicology. *J. Pharm. Pharmacol.* 1998; 50, 395-405.
- **Kuluncsics Z, Perdiz D, Brulay E, Muel B, Sage E.** Wavelength dependence of ultraviolet-induced DNA damage distribution: involvement of direct or indirect mechanisms and possible artefacts. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1999; 49: 71-80
- **Kumar, Sudhir & Subramanian, Sankar.** Mutation rates in mammalian genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2002; 99, 803-808.
- **Largent EJ.** Rates of elimination of fluoride stored in the tissues of man. *Arch Ind Hyg Occup Med*, 1952, vol. 6, p. 37-42.
- **Lee J, Koo N, Min DB.** Reactive oxygen species, aging and antioxidants nutraceuticals. *Compreh Rev Food Science and Food Safety*, 2004, vol. 3, p. 21-33.
- **Leon J. and Pellicer A.** Ras genes involvement in carcinogenesis: Lessons from animal model systems. In: *The ras superfamily of GTPases.* J.C. Lacal and F. McCormick eds. CRC press Boca Raton 1993; pp 3-36.
- **MacGregor J. T., Wehr C. M., Gould D. H.** Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test. *Environ. Mutagen*, 1980, vol. 2, p. 509-514.
- **Mahata, J., Chaki, M., Ghosh, P., Das, L. K., Baidya, K., Ray. K., Natarajan, A. T. and Giri, A. K.,** Chromosomal aberrations in arsenic exposed human populations: a review with special reference to a comprehensive study in West Bengal, India. *Cytogenet. Genome Res.*, 2004, 104, 359–364.
- **Majone F, Brunetti R, Gola I, Levis A.** Persistence of micronuclei in the marine mussel, *mytilus galloprovincialis*, after treatment with Mitomycin C. *Mutat. Res.* 1987, vol. 191, p.157-161.

- **Marinho VC, Higgins JP, Logan S, Sheiham A.** Fluoride gel for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev*, 2002, vol. 2, p. 2280.
- **Marinho VC, Higgins JP, Sheiham A, Logan S.** Fluoride toothpastes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003, vol. 1, p. 2278.
- **Mascarenhas AK.** Risk factors for dental fluorosis: a review of the recent literature. *Pediatr Dent*, 2000, vol. 22, p. 269-77.
- **Matter B., Schmid W.** Trenimon-induced chromosomal damage in bone-marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micronucleus test. *Mutat. Res*, 1971, vol. 12, p. 417- 425.
- **Mavournin K. H., Blakey D. H., Cimino M. C., Salamone M. F., Heddle J. A.** The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res*, 1990, vol. 239, p. 29-80.
- **Mc Vaugh, R.** Flora of Peru. Myrtaceae I. Field Museum of Natural History. *Botanical Series*, 1958, Vol. 13, nº 2, p. 569-812.
- **Mc Vaugh, R.** Tropical American Myrtaceae II. Field Museum of Natural History. *Botanical Series*, 1963, Vol. 29, nº 8, p. 395-532.
- **Mella S, Molina X, Alalah S.** Prevalence of dental fluorosis and its relation with fluoride content of comunal drinking water. *Rev Med Chile*, 1994, vol. 122, p. 1263-1270.
- **Mendoza, O., C. Picón, J. Gonzáles.** Informe de la expedición de recolección de germoplasma de camu camu (*Myrciaria dubia*) en la amazonía peruana. Informe Técnico N° 11. Programa de Investigación en Cultivos Tropicales. INIA, Lima, 1989, 19 p

- **Meydani M.** Effect of functional food ingredients: vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly. *Am J Clin Nutr*, 2000, vol. 71, p. 16655-16685.
- **Miller B. M., Adler I. D.** Application of antikinetochores antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*. *Mutagenesis*, 1990, vol. 5, p. 411-415.
- **Miller JA, Miller EC.** Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer* 1981; 47: 2327
- **MINSA.** Ministerio de Salud del Perú. Resolución Ministerial 154-2001-SA/DM. 2001
- **Miyazawa T, Nakagawa K, Kudo M, Muraishi K, Someya K.** Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. *J Agric Food Chem*, 1999, vol. 47, nº 3, p. 1083-1091.
- **Monsour PA, Kruger BJ.** Effect of fluoride on soft tissues in vertebrates. *Fluoride*, 1985, vol. 18, p. 53-61.
- **Morales-González JA, Bueno-Cardoso A, Marichi-Rodríguez F, Gutiérrez-Salinas J.** Programmed cell death (apoptosis): the regulating mechanisms of cellular proliferation. *Arch Neurocién (Mex)*, 2004, vol. 9, p. 85-93.
- **Moure, A., Cruz M., Franco D., Domínguez M. J., Siniero J., Domínguez H., Núñez J. M., Pájaro C. J.** Natural antioxidant from residual sources. *Food Chem*, 2001, vol. 72, p.145-171.
- **Müller L., Kikuchi Y., Probst G., Schechtman L., Shimada H., Sofuni T., Tweats D.** ICH-harmonised guidances on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Mutat. Res*, 1999, vol. 436, p. 195-225.



- **Natarajan AT, Obe G.** How do *in vivo* mammalian assays compare to *in vitro* assays in their ability to detect mutagens? *Mutat Res* 1986; 167:189-201.
- **Neuman WFD., Neuman MW., Main ER., O'Leary J., Smith FA.** The surface chemistry of bone. II. Fluoride deposition. *J Biol Chem*, 1950, vol. 187, p. 655-661.
- **Norppa H., Falck G. C.** What do human micronuclei contain?. *Mutagenesis*, 2003, vol. 18, p. 221- 233.
- **O'Mullane DM, Ketley CE, Cochran JA, Whelton HP, Holbrook WP, van Loveren C, Fernandes B, Seppa L, Athanassouli T.** Fluoride ingestión from toothpaste: conclusions of European Union-funded multicentre project. *Community Dent Oral Epidemiol*, 2004, vol. 32, nº 1, p. 74-76.
- **Pendrys DG.** Risk of enamel fluorosis in nonfluoridated and optimally fluoridated populations: considerations for the dental professional. *J Am Dent Assoc*, 2000, vol. 131, nº 6, p. 746-755.
- **Perdiz D, Gróf P, Mezzina M, Nikaido O, Moustacchi E, Sage E.** Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of dewar photoproducts in solar mutagenesis. *JBC*. 2000; 275 (35): 26732-26742.
- **Peters, Ch.; Vásquez, A.** Estudios Ecológicos de Camu camu *Myrciaria dubia*. I. Producción de Frutos en Poblaciones Naturales. *En: Acta Amazónica* 16 -17 (Número único). Brasil. 1986. pp. 161-174.
- **Pfuhler S., Albertini S., Fautz R., Herbold B., Madle S., Utesch D., Poth A.** Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation part IV: Recommendation of a working group of the Gesellschaft fuer Umwelt- Mutationsforschung (GUM) for a simple and straightforward approach to genotoxicity testing. *Toxicol. Sci.* 2007; 97, 237-240.

Pharmaceuticals, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Step 4 Guideline, 16 July 1997.

- **Pinedo, P.M., W. D. Jong.** Camu camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae) un arbusto amazónico de áreas inundables con alto contenido de vitamina C en Loreto, Perú. En: *Productos Forestales, Medios de Subsistencia y Conservación; Estudios de Caso sobre Sistemas de Manejo de Productos Forestales No Maderables*. Alexiades, M. y Shanley, P. Ed. Volumen 3 – América Latina, 2004. Capítulo 14. 275-294 p.
- **Pryor, W.A.** Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials, *Free Radical Biol. Med.* 2000, vol. 28, p. 141–164.
- **Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C.** Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002;418:934.
- **Ramel C.,** Antimutagenesis and Anticarcinogenesis a Mechanisms in: D.M. Shankel, P.E. Hartmas, T. Kada and A. Hollaender (Eds.), Plenum, New York; 1986.p.511-517.
- **Rapp UR, Ceteci F, Screck R.** Oncogene-induced plasticity and cancer stem cells. *Cell Cycle*. 2008; 7: 45-51.
- **Refsnes F, Lag T, Skuland T, Samuelsen J, Schwarze P.** Fluoride-induced apoptosis and necrosis in a human lung epithelial cell line: involvement of PKA and PKC-mediated mechanism. *Toxicol Lett*, 1998, vol. 95, nº 1, p. 107.
- **Requena-Condori, R. M. 2008.** Demanda y oferta de camu camu <http://www.monografias.com/trabajos35/demanda-camu-camu/demanda-camu-camu.shtml>,(09.12.2008)
- **Rigalli A, Beinlich A, Puche RC.** Intestinal absorption of fluoride at high luminal concentration of fluoride. *Arzneimittelforschung*, 2001, vol. 51, p. 151-155.

- **Riordan P.** Dental fluorosis decline alter chaanges to supplement and toothpaste regimens. *Community Dent Oral Epidemiol*, 2002, vol. 30, p. 233-240.
- **Roca N. A.** Estudio químico-bromatológico de la Myrciaria paraensis Berg. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Tesis de Química. 51pp. 1965.
- **Rochette P J, Therrien J P, Drouin R, Perdiz D, Bastien N, Drobetsky E A, Sage E.** UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine–thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells. *Nucleic Acids Research* 2003; 31 (11): 2786-2794
- **Rzeuski R, Chlubek D, Machoy Z.** Interactions between fluoride and biological free radical reactions. *Fluoride*, 1998, vol. 31, nº 1, p. 43-45
- **Sanchez AA.** Cáncer hereditario. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). 1ra. Ed. Madrid: Editorial Roche. 2006:1-188.
- **Schmid W,.** The micronulceus test. *Mut Res*, 1975, vol. 31, p. 9-15
- **Sharpe, C.R, E. L. Franco, B. de Camargo, L.F. Lopes, J.H. Barreto, R.R. Johnsson, M.A. Mauad.** Parental exposures to pesticidas and risk of Wilms' tumor in Brazil. *Am. J. Epidemiol.* 1995;141: 210-217.
- **Shivarajashankara YM, Shivashankara AR, Gopalakrishna Bhat P, Hanumanth Raoc S.** Effect of fluoride intoxication on lipid peroxidation and antioxidant systems in rats. *Fluoride*, 2001, vol. 34, nº 2, p. 108-113.
- **Simic D, Vukovic-Gacic B, Knezevic-Vukcevic J.** Detection of natural bioantimutagens and their mechanisms of action with bacterial assay-system. *Mutat Research* 1997; 402:51-57.
- **Skotowski MC, Hunt RJ, Levy SM.** Risk factors for dental fluorosis in pediatric dental patients. *J Public Health Dent*, 1995, vol. 55, nº 3, p.154-159.

- **Stopper H., Müller S. O.** Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A minireview. *Toxicology in Vitro*, 1997, vol. 11, p. 661-667.
- **Szpunar SM, Burt BA.** Evaluation of appropriate use of dietary fluoride supplements in the U.S. *Comm Dent Oral Epidemiol*, 1992, vol. 20, p. 148-154.
- **Tinwell H., Ashby J.** Micronucleus morphology as a means to distinguish aneugens and clastogens in the mouse bone marrow micronucleus assay. *Mutagenesis*, 1991, vol. 6, p. 193- 198.
- **Trautinger F.** Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. *Clin Exp Dermatol* 2001; 26: 573-577.
- **Trautinger F.** Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. *Clin Exp Dermatol* 2001; 26: 573-577.
- **Tsutsui T., Suzuki N., Ohmori M.** Cytotoxicity, chromosome aberrations and unscheduled DNA synthesis in cultured human diploid fibroblasts induced by sodium fluoride. . *Mutation Res*, 1984, vol. 139, n° 4, p. 193-198.
- **Tsutsui T., Suzuki N., Ohmori M.** Sodium fluoride-induced morphological and neoplastic transformation, chromosome aberrations, sister chromatid exchanges, and unscheduled DNA synthesis in cultured Syrian hamster embryo cells. *Cancer Res*, 1984, vol. 44, n° 3, p. 938-941.
- **Twetman S, Axelsson S, Dahlgren H, Holm AK, Kallestal C, Lagerlof F, Lingstrom P, Mejare I, Nordenram G, Norlund A, Petersson LG, Soder B.** Caries-preventive effect of fluoride toothpaste: a systematic review. *Acta Odontol Scand*, 2003, vol. 61, n° 6, p. 347-55.
- **Velioglu Y. S, Mazza G., Gao L., Oomah B. D..** Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chem*, 1998, vol. 46, p. 413-417.

- **Verschooten L, Claerhout S, Vlaethem A, Agostinis P, Garmyn M.** New strategies of photoprotection. *Photochemistry and Photobiology* 2006a; 82: 1016-1023.
- **Vijayalaxmi K.K, Venu R.** *In vivo* anticlastogenic effects of L – ascorbic acid in mice. *Mutation Res*, 1999, vol. 438, p. 47 – 51.
- **Villachica, H.** Frutales y Hortalizas Promisorios de la Amazonía. En: Tratado de Cooperación Amazónica. Lima (Perú): *Secretaría Pro Tempore*, 1996, p. 76-83.
- **Villachica, H; Lazarte, J; Clavo, M; Lezcano, C; Arroyo, M y Díaz I.** Productos amazónicos del Perú: Palmito, Camu camu y Uña de gato. CODESU – CIID. Pucallpa – Perú. 144p. 1998.
- **Waldbottj.** Incipient chronic fluoride intoxication from drinking water: report of 52 cases. *Acta Med Scand*, 1956, vol. 156, p.157-168.
- **Wang AG, Chu QL, He WH, Xia T, Liu JL, Zhang M, Nussier AK, Chen XM, Yang KD.** Effects on protein and mRNA expression levels of p53 induced by fluoride in humans embryonic hepatocytes. *Toxicol Lett*, 2005, vol. 158, p. 158-163.
- **Wang C, Wang J, Lin W, Chu C, Chou F, Tseng T.** Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food Chem Toxicol*, 2000, vol. 38, nº 5, p. 411-416.
- **Wang, H., G. Cao, and R. L. Prior.** Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem*, 1996, vol. 44, p. 701-705.
- **Wang, S. Y., and H. S. Lim.** Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and development stage. *J. Agric. Food Chem*, 2000, vol. 48, p. 140- 146.

- **Waterhouse C., Taves D., Munzer A.** Serum inorganic fluoride: changes related to previous fluoride intake, renal function and bone resorption. *Clin Science*, 1980, vol. 58, p. 145-52.
- **Wattenberg L.W.** Inhibitors of chemical carcinogens, in: Burchenal, J.H; Oettgen, H.F (Eds.), *Cancer: Achievements, Challenges and Prospects for the 1980s*, Grune and Stratton, New York, NY; 1981.p.517-540.
- **Weinstein IB, Joe A.** Oncogene addiction. *Cancer Res.* 2008; 68: 3077-80.
- **Whitford GM.** The metabolism and toxicity of fluoride. *Monogr Oral Sci*, 1989, vol.13, p. 1-158.
- **Winn, D., L. Robinson, J. Mulvihill, A. Daigle & J. Fraumeni.** A case-control study of the aetiology of Ewing's sarcoma. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1992;1: 525-532.
- **World Health Organization Fluorides and oral health.** Report of a WHO expert committee on oral health status and fluoride use. Geneva: WHO. 1994.
- **Xue W, Warshawsky E.** Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 206:73-93.
- **Yamamoto K. I., Kikuchi Y.** A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutat. Res*, 1980, vol. 71, p. 127-131.
- **Yu Z, Chen J, Ford BN, Brackley ME, Glickman BW.** Human DNA Repair Systems: An Overview. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1999; 33:3-20.
- **Yuyama L, Aguiar J Yuyama K, Lopes T, Fávaro D, Bergl P, Vasconcellos M.** Content of mineral elements in some populations of camu-camu. *Acta Amazónica*, 2002, vol. 33, p. 549 - 554.
- **Yuyama, K., J. Aguiar y L. Yuyama.** Camu-camu: um fruto fantástico como fonte de vitamina C. *Acta Amazónica*, 2002, vol. 32, nº 1, p. 169-174.

- **Zapata, S.M.; Dufour, J.P.** Camu-camu *Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh: chemical composition of fruit. *Journal of the science of food and agriculture. J. sci. food agric.* 1993, vol.61, n° 3, p. 349-351.
- **Zeiger E.** Identification of rodent carcinogens and noncarcinogens using genetic toxicity tests: premises, promises, and performance. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 1998; 28,85-95.
- **Zhan XA, Wang M, Xu ZR, Li WF, Li JX.** Evaluation of caspase-dependent apoptosis during fluoride-induced liver lesion in pigs. *Arch Toxicol*, 2005, vol. 78, p. 145-156.
- **Zheng, W., and S. Y. Wang.** Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem*, 2001, vol. 49, p. 5165-5170.
- **Zipkin I., Likins RC., McClure FJ., Steere AC.** Urinary fluoride levels associated with use of fluoridated waters. *Public Health Rep*, 1956, vol. 71, p. 767-72.
- **Zong W, Ditsworth D, Bauer D, Wang Z, Thompson C.** Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev.* 2004. Jun 1; 18(11):1272-82.

## ANEXO I

**Cuadro N° 1:** Análisis Químico del Fruto de *Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh "camu camu" (mg/100g de pulpa) (Roca 1965).

COMPONENTES	(g)
Calorías	17,0
Humedad	94,4
Proteínas	0,5
Aceite	-
Carbohidratos	4,7
Fibra	0,6
Ceniza	0,2
MINERALES	(mg)
Calcio	27,0
Fósforo	17,0
Hierro	0,5
VITAMINAS	(mg)
Caroteno	0,01
Tiamina (Vit.B1)	0,01
Riboflavina (Vit.B2)	0,04
Niacina (Vit.B5)	0,62
Ácido ascórbico reducido	2.880

Fuente: Chávez Flores (1993)

**Cuadro N° 2:** Contenido de ácido ascórbico, proteínas y carbohidratos (mg/100g) en

FRUTA	ÁCIDO ASCÓRBICO	PROTEÍNA	CARBOHIDRATOS
Piña	20	0,4	9,8
Maracuyá (jugo)	22	0,9	15,8
Fresa	42	0,7	8,9
Limón (jugo)	44	0,5	9,7
Guayaba	60	0,5	14,9
Naranja ácida	92	0,6	10,1
Marañón	108	0,8	10,5
Acerola (total)	1.300	0,7	6,9
Camu Camu total	2.780	0,5	5,9

la pulpa de algunas frutas tropicales maduras.

Fuente: Villachica (1996)



**Cuadro Nº 3:** Exportación Anual de *Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh “camu camu”.

MERCADO	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007 (*)	
	Valor Fob US\$	Valor Fob US\$	Valor Fob US\$	Valor Fob US\$	Valor Fob US\$	Valor Fob US\$	Valor Fob US\$	Partic. %
JAPÓN	28,496	591,368	189,168	343,227	738,502	1,696,255	2,574,529	81.32
ESTADOS UNIDOS	10,669	10,279	42,398	126,057	97,507	262,164	133,150	4.21
PAÍSES BAJOS	4	10	0	14,106	40,975	87,636	400,368	12.65
HONG KONG	0	0	0	0	0	46,170	18,200	0.57
CANADÁ	10	0	0	2,125	2,607	7,450	18,235	0.58
GUATEMALA	0	0	0	0	0	9,120	0	0.00
VENEZUELA	0	0	0	0	4,623	7,512	7,518	0.24
REINO UNIDO	2	10	0	1	982	7,315	5,550	0.18
SUIZA	0	2,007	2,400	0	4,900	4,595	1,980	0.06
AUSTRIA	0	0	0	0	0	2,100	0	0.00
TAIWAN	0	0	0	0	0	1,599	0	0.00
ALEMANIA	19	2,850	8	2,867	1,261	1,004	0	0.00
ITALIA	0	0	0	2,105	400	882	0	0.00
ARUBA	0	0	0	0	0	490	0	0.00
ESPAÑA	0	0	0	0	540	142	0	0.00
FRANCIA	0	0	0	22	1	72	0	0.00
CHILE	0	0	0	0	0	6	0	0.00
AUSTRALIA	0	0	0	1	578	0	1,125	0.04
BOLIVIA	0	362	0	0	0	0	0	0.00
BRASIL	0	195	0	0	13,672	0	738	0.02
COSTA RICA	0	0	0	0	30	0	0	0.00
DINAMARCA	0	0	0	0	0	0	0	0.00
EMIRATOS ÁRABES	0	0	0	0	6	0	0	0.00
UNIDOS								
INDIA	0	0	0	46,630	0	0	0	0.00
NUEVA ZELANDA	0	0	0	0	0	0	120	0.00
ECUADOR	0	0	0	0	0	0	4,491	0.14
INDONESIA	0	0	0	19,550	0	0	0	0.00
<b>TOTALES</b>	<b>39,200</b>	<b>607,081</b>	<b>233,974</b>	<b>556,691</b>	<b>906,585</b>	<b>2,126,242</b>	<b>3,166,004</b>	<b>100.00</b>

Fuentes: Base de dato de investigación Eco. Ricardo Ferronay - IIAP.

Biocomercio – PromPeru. Pagina Web:

[http://www.biocomercioperu.org/reporte/reporte\\_ex\\_pade\\_vfu.asp?producto=CAMU%20CAMU%20Y%20SUS%20DERIVADOS&reporte=ex\\_pade\\_vfu](http://www.biocomercioperu.org/reporte/reporte_ex_pade_vfu.asp?producto=CAMU%20CAMU%20Y%20SUS%20DERIVADOS&reporte=ex_pade_vfu)

(\*) Datos actualizados a Octubre de 2007

**Cuadro Nº 4:** Ensayos recomendados como parte de una Batería estándar de Genotoxicidad.

<b>Tipo de ensayo</b>	<b>Efecto genotóxico a evaluar y sistema experimental</b>	<b>Ensayo realizado de forma habitual</b>
<i>In vitro</i>	Mutación génica en bacterias	Test de Ames
<i>In vitro</i>	Mutación génica y/o aberraciones cromosómicas en células de mamífero	Ensayo del linfoma de ratón o de aberraciones cromosómicas
<i>In vivo</i>	Aberraciones cromosómicas en células hematopoyéticas de roedor	Ensayo de micronúcleos en roedor

Fuente: Fenech M. (1999)



## ANEXO II

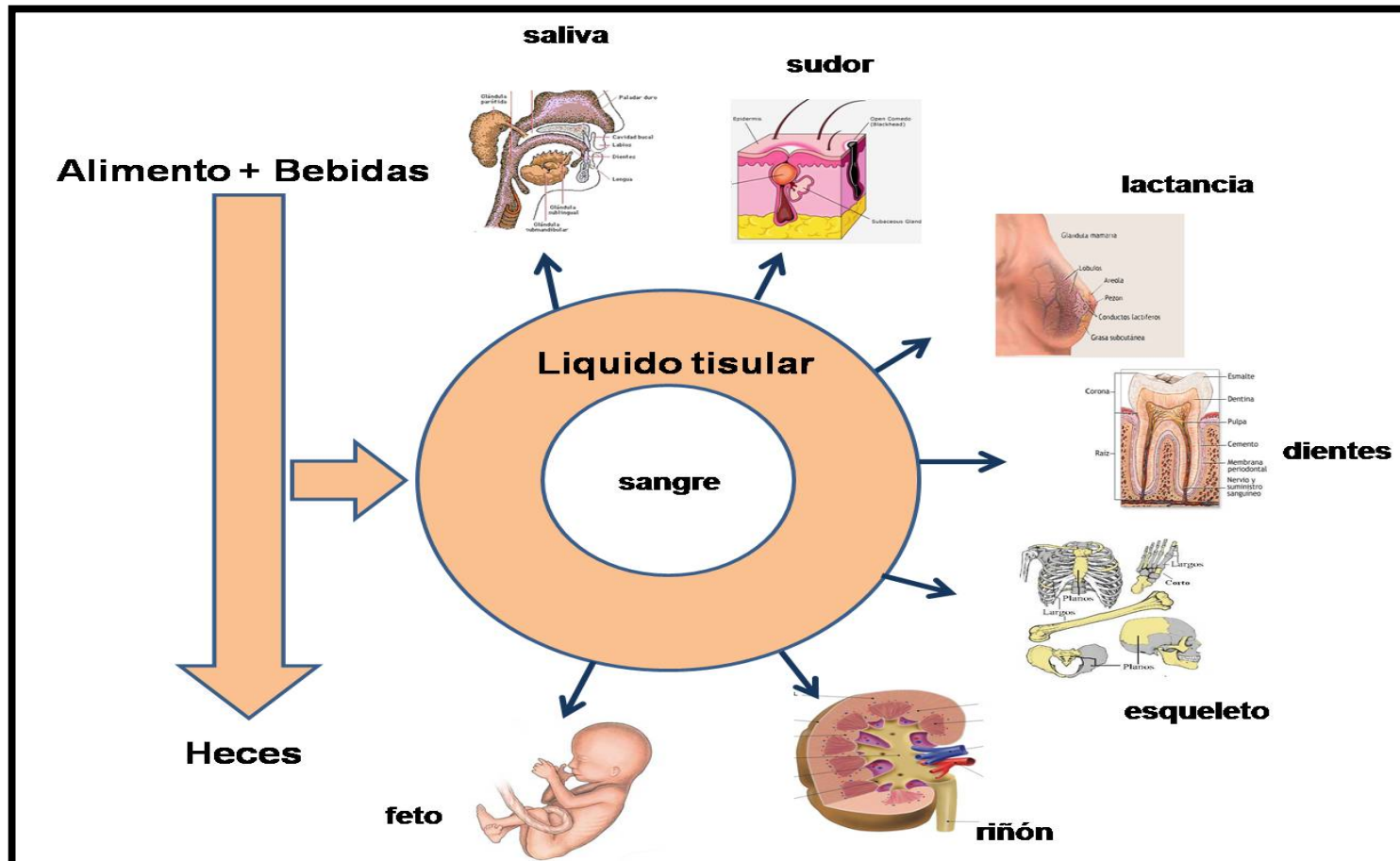
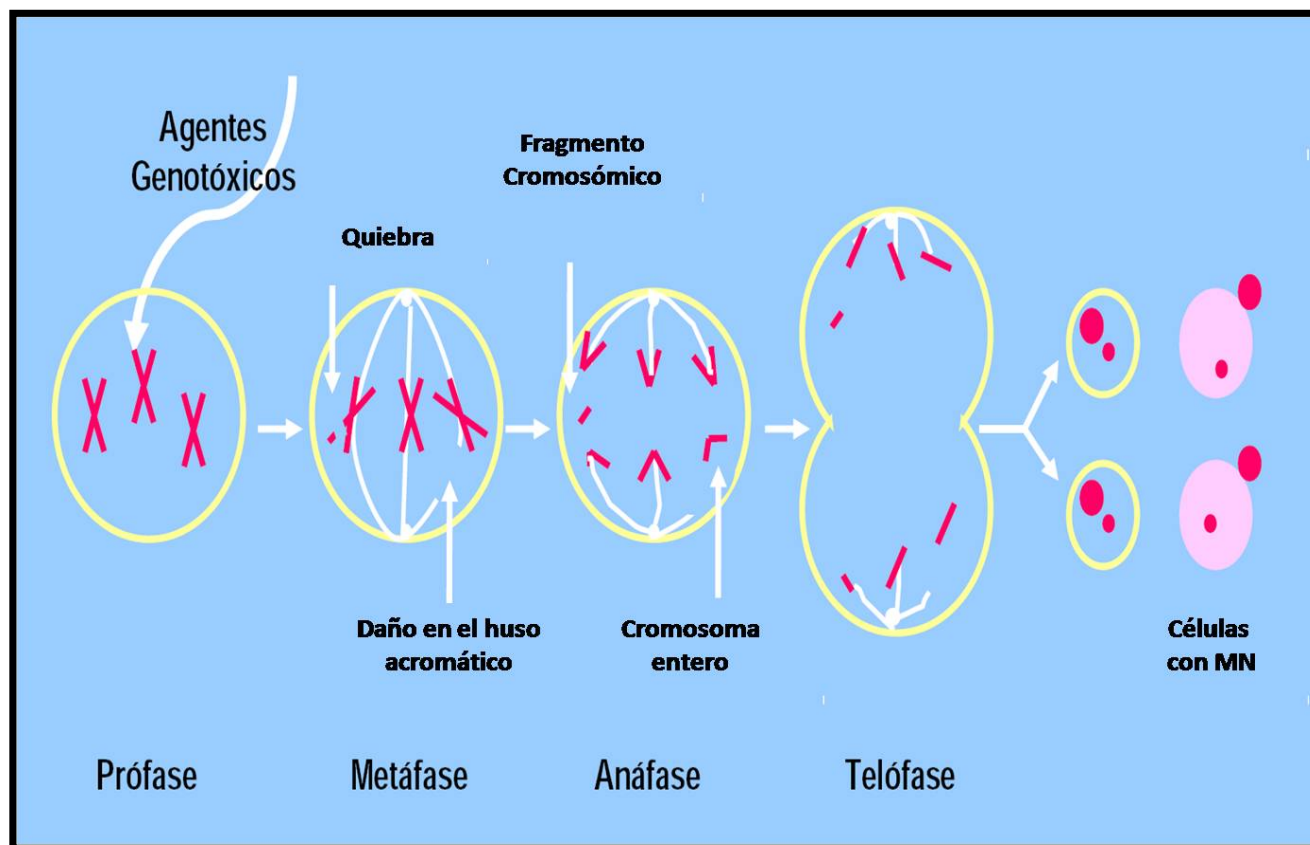
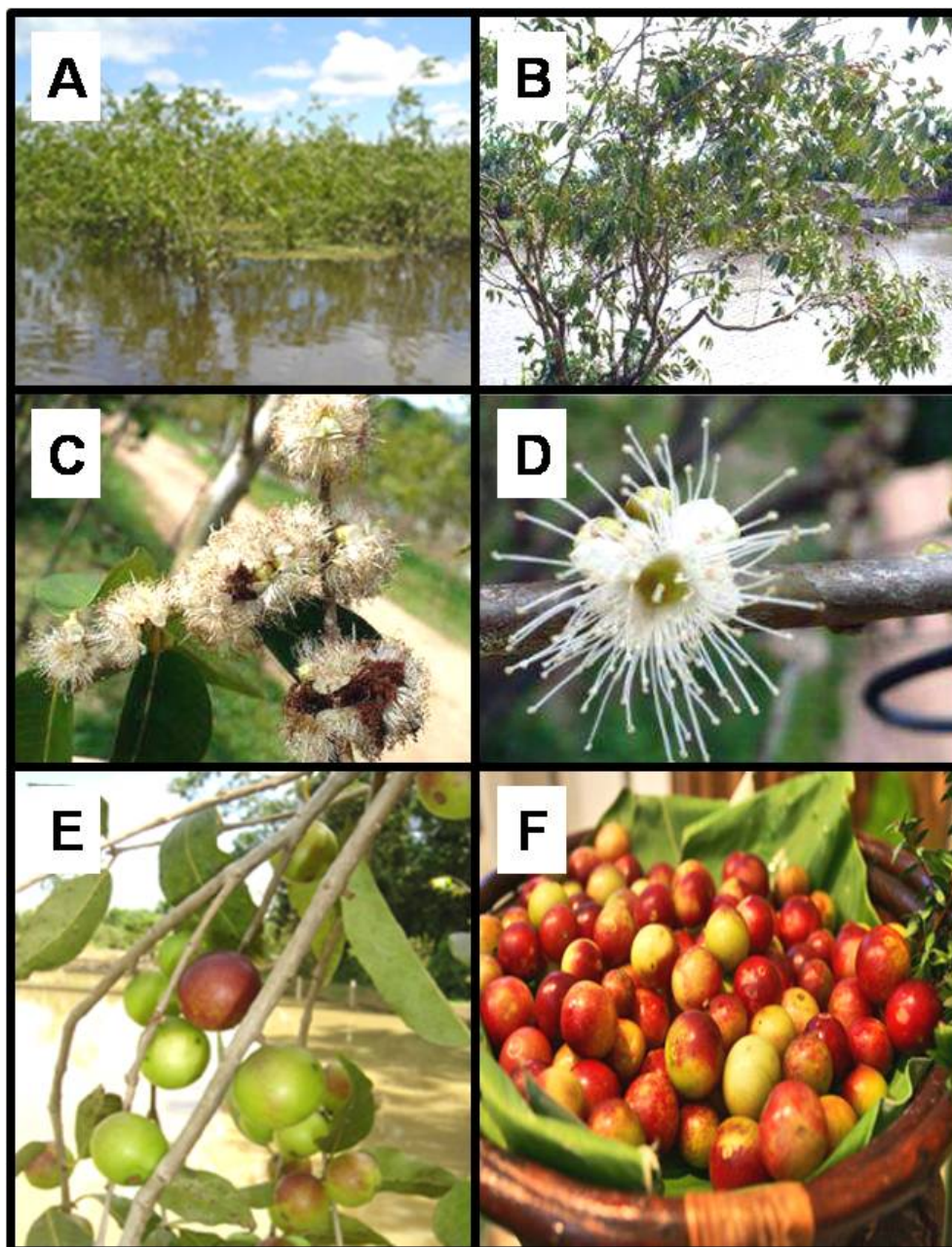


Figura N° 1: Homeostasis del NaF en el organismo



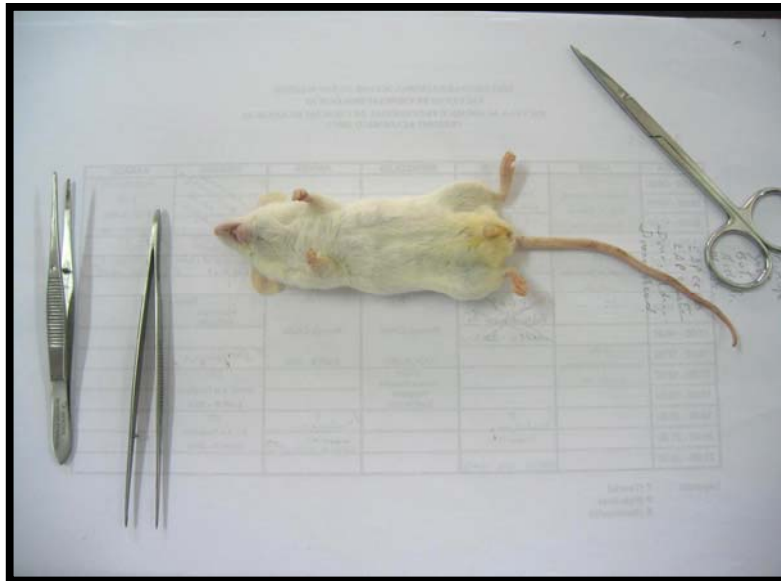
**Figura Nº 2:** Formación de micronúcleos en médula ósea de ratón.

### ANEXO III

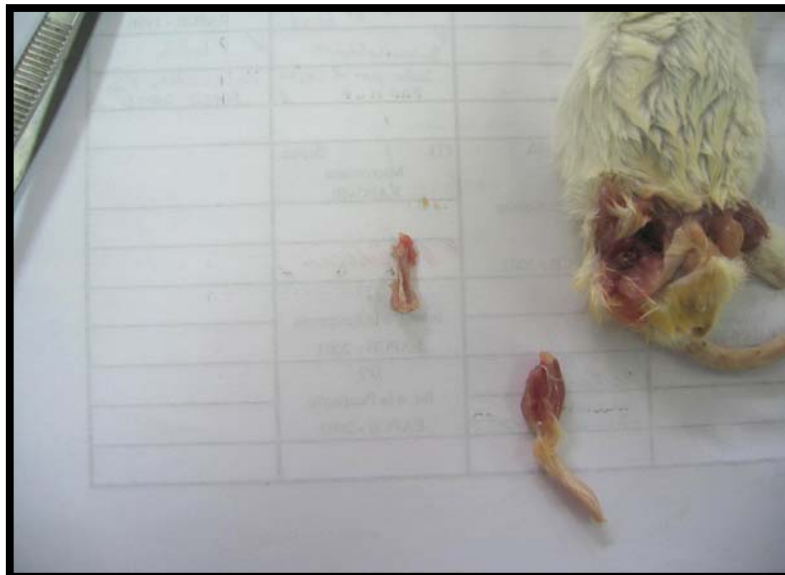


**Fotografía N° 1:** Descripción de *Myrciaria dubia* H.B.K. MC Vaugh “camu camu” A) Cultivo Natural camu - camu, B) Planta arbustiva, C) Rama con Inflorescencia, D) Inflorescencia Axial, E) Frutos inmaduros, F) Frutos maduros

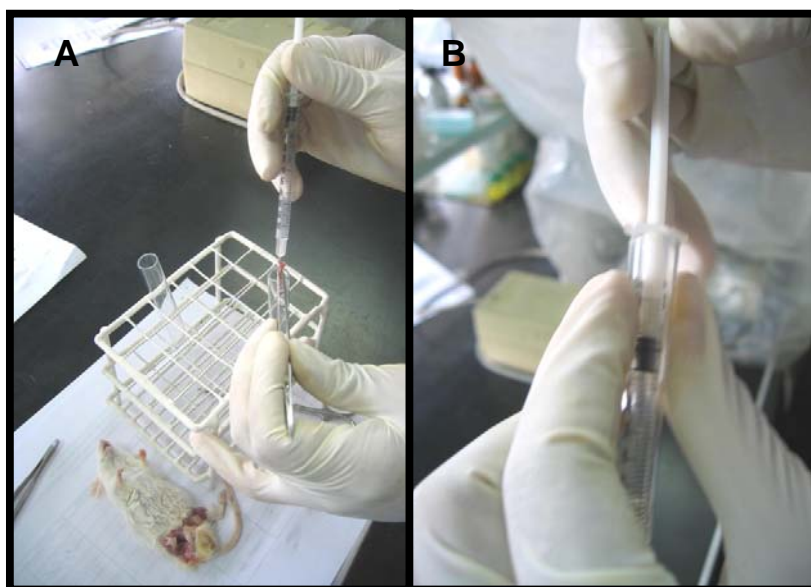




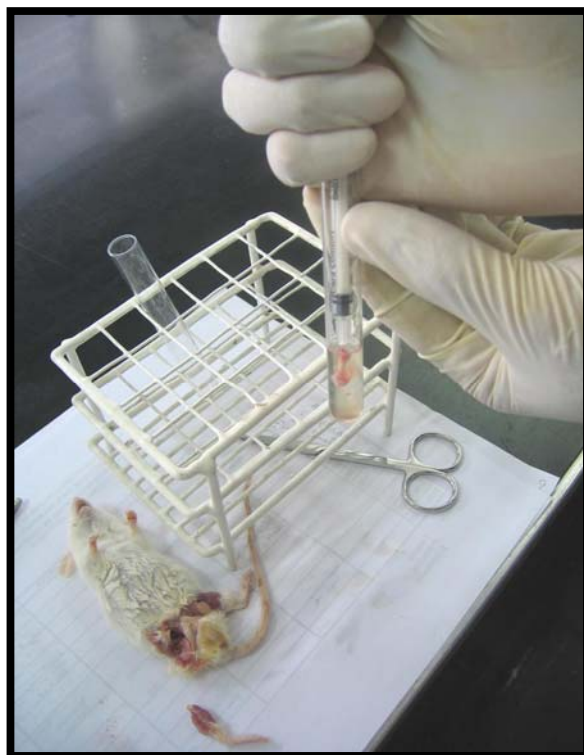
**Fotografía Nº 2:** Preparación de material biológico.



**Fotografía Nº 3:** Obtención del fémur.

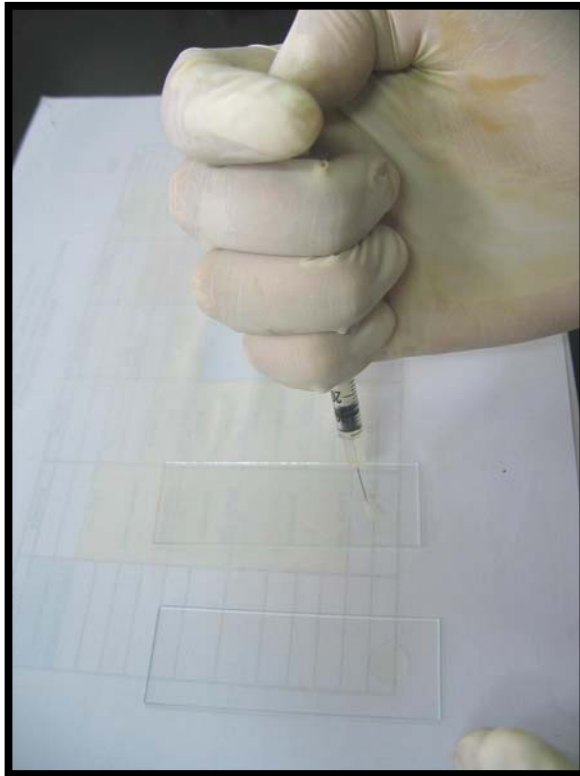


**Fotografía N° 4:** (A) Perfusión y (B) Lavado del fémur.

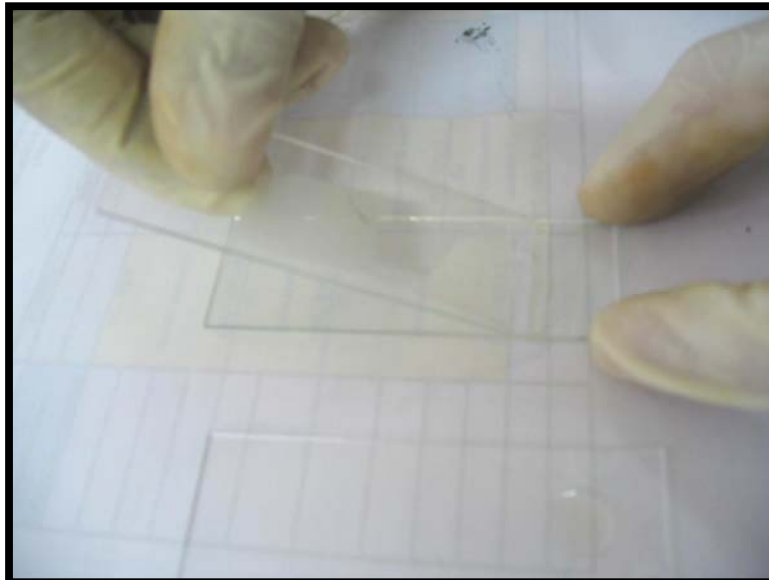


**Fotografía N° 5:** Lavado del fémur para la obtención de eritrocitos

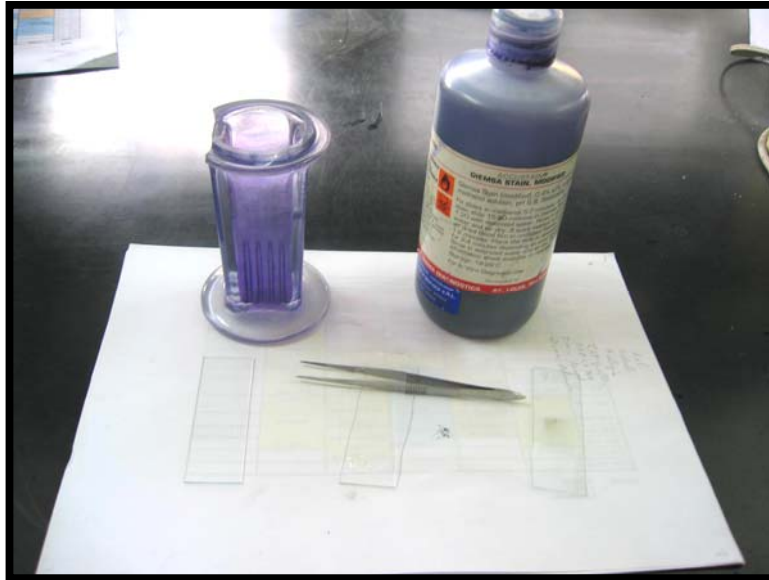




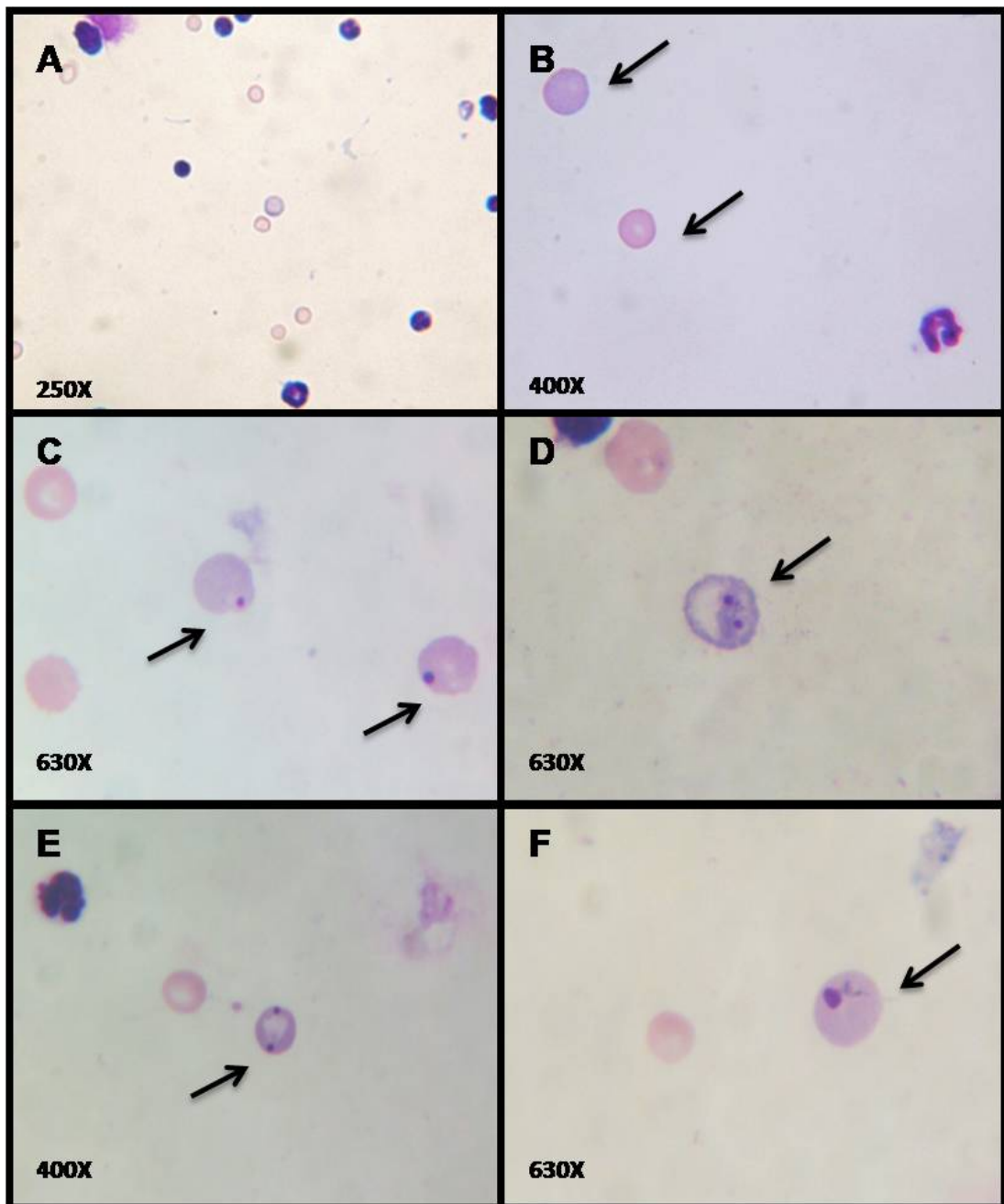
**Fotografía N° 6:** Preparación y goteo en láminas porta objeto de las muestras eritrocitos de médula ósea de ratón.



**Fotografía N° 7:** Frotis de médula ósea de ratón.



**Fotografía Nº 8:** Coloración de láminas portaobjetos con el colorante Giemsa preparadas en buffer fosfato salino pH 6,8.



**Fotografía N° 9:** A) Vista panorámica de células de medula ósea de ratón. Indicados por flechas podemos ver en B) un eritrocito policromático (EPC) de color azul y otro normocromáticos (ENC) de color rosado. En C), D), E) y F) eritrocitos policromáticos micronucleados (EPMs).